

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**ESTUDIO DE LA VASODILATACIÓN  
INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE  
LA VÍA DEL NO/GMP, DE LOS  
CANALES  $K_{ATP}$  Y DE LA ATPASA  
 $Na^+/K^+$  EN ARTERIAS PULMONARES  
Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN**

**TESIS DOCTORAL**  
Angel Luis Cogolludo Torralba

**DIRECTORES:**  
Prof. Juan Tamargo Menéndez  
Dr. Francisco Pérez Vizcaíno



*A mi familia*

*A Merche*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido el fruto de un laborioso trabajo y de un intenso esfuerzo personal sólo posible gracias al excepcional ambiente que me ha rodeado durante estos años. Por ello quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Juan Tamargo Menéndez, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina (U.C.M) y director de esta Tesis Doctoral, por su excelente dirección y dedicación, acompañadas de su buen humor. Por haber depositado su fe en mí y haberme hecho madurar desde todos los puntos de vista.

Al Dr. Francisco Pérez Vizcaíno, codirector de esta Tesis Doctoral, por despertar en mí la pasión por la investigación, por su inapreciable ayuda y por hacer agradable el trabajo del día a día en la búsqueda del ansiado *Nature*, pero sobre todo por su gran amistad y por aguantarme todo este tiempo dando muestras de lo buena gente que es (aunque sea del Atleti).

Al Prof. Angel Villar del Fresno, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia (U.C.M) por haber accedido gustosamente a ser el ponente de esta Tesis Doctoral.

Al Prof. Pedro Lorenzo Velázquez, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina (U.C.M) por haberme acogido con agrado y facilitar en todo momento mi labor investigadora en dicho Departamento .

A la Dra. Carmen Valenzuela por representar un modelo como profesional y sobre todo como persona, por ser siempre tan comprensiva. A la Prof. Eva Delpón por su apoyo y simpatía en todo momento y por el cariño que me ha mostrado en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio Susana Fajardo, Francisco Zaragozá, Manuel Ibarra y Gustavo López por su inestimable apoyo y por permitir la convivencia en perfecta armonía (donde caben 2 caben ... ¿8?).

Al Ldo. Ricardo Caballero por su gran amistad durante estos años. Por tener tan gran corazón. A las Ldas. Mónica Longobardo y Teresa González por su interés y apoyo.

A Cristina Rivas por su enorme ayuda y por su facilidad para emanar alegría y optimismo hacia los que la rodean. Gracias por todo Cris. A Isabel Ocaña por solucionarlo todo y por su simpatía.

Al Dr. Eduardo Villamor por su ingenio y buen humor, que facilitaron el paso de las horas que compartimos en el laboratorio.

---

Al Prof. Fernando de Andrés, por su facilidad para transmitir ideas y su gran sentido del humor que me han permitido disfrutar de muy agradables momentos.

A las Dras. Laura Franqueza, Buensuceso Fernández y Cristina Fernández por su acogida y su inestimable ayuda en "mis comienzos".

A todos los miembros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina (U.C.M), a los que evito nombrar por el riesgo de dejarme a alguien en el tintero. Gracias por su apoyo y colaboración a lo largo de estos años.

A mis compañeros de Licenciatura Jose Luis Arbeloa, David Castro, Rubén Conejo, David Andres, Francisco Carpintero y Eduardo Camarero (los 7 magníficos), que siguen caminos paralelos en otros Departamentos de esta Universidad y con quienes sigo compartiendo alegrías, esperanzas y desvelos.

Finalmente, a la Comunidad de Madrid que me concedió la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral y establecer una colaboración estable con el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Manchester.

---

---

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL

A-II	Angiotensina II
AA	Ácido araquidónico
ACh	Acetilcolina
ACP	Agonista de canales de K <sup>+</sup>
AMPc	AMP cíclico
ANP	Péptido natriurético atrial
4-AP	4-Aminopiridina
[ATP] <sub>i</sub>	Concentración de ATP intracelular
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> libre intracelular
CaM	Calmodulina
CaMKII	Calmodulina cinasa II
CMLV	Célula muscular lisa vascular
DAG	Diacilglicerol
ECE	Enzimas convertidoras de endotelina
EDHF	Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio
EDRF	Factor relajante dependiente de endotelio
E <sub>max</sub>	Efecto máximo relajante
ET	Endotelina
F340/F380	Cociente de la fluorescencia emitida a las longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm
GMPc	GMP cíclico
HPPN	Hipertensión pulmonar persistente neonatal
5-HT	Serotonina
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trifosfato
[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub>	Concentración de K <sup>+</sup> extracelular
K <sub>A</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje de rápida activación-inactivación
K <sub>ATP</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de ATP
K <sub>Ca</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de Ca <sup>2+</sup>
K <sub>IR</sub>	Canales de K <sup>+</sup> rectificadores internos
K <sub>V</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje, que presentan rectificación tardía
Log CR	Logaritmo del cociente entre la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto máximo en presencia y en ausencia de antagonista
LT	Leucotrieno
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
NA	Noradrenalina
[Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Na <sup>+</sup> intracelular
NO	Óxido nítrico
NOi	Óxido nítrico inhalado
NOS	Óxido nítrico sintasa

---

NPS	Nitroprusiato sódico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona
pD <sub>2</sub>	Concentración de fármaco necesaria para obtener el 50% del efecto máximo expresada como logaritmo negativo
PG	Prostaglandina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil-4,5-bifosfato
PK (A, C y G)	Proteínas cinasas (A, C y G)
PMA	Éster de forbol 12-miristato, 13-acetato
PMCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> de la membrana plasmática
pCO <sub>2</sub>	Presión parcial de CO <sub>2</sub>
pO <sub>2</sub>	Presión parcial de O <sub>2</sub>
ROC	Canales de Ca <sup>2+</sup> activados por receptor
RS	Retículo sarcoplásmico
RVP	Resistencias vasculares pulmonares
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNAP	S-Nitroso N-Acetil-D,L-penicilamina
Solución OK <sup>+</sup>	Solución nutricia carente de K <sup>+</sup>
ST	Estaurosporina
SUR	Receptor de sulfonilureas
TEA	Tetraetilamonio
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje
VPH	Vasoconstricción pulmonar hipóxica

---

# ***ÍNDICE***

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>I.I. HIPERTENSIÓN PULMONAR PERSISTENTE NEONATAL (HPPN)</b>	14
<b>I.II. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL</b>	15
I.II.1 Características generales de la pared arterial	15
I.II.2 Características estructurales de las arterias pulmonares	16
I.II.3 Desarrollo de la vasculatura pulmonar en el feto	16
I.II.4 Adaptación estructural de la vasculatura pulmonar tras el nacimiento	17
I.II.5 Anomalías estructurales asociadas a la HPPN	18
<b>I.III. VENTILACIÓN Y OXIGENACIÓN PULMONAR</b>	19
I.III.1 Papel de la ventilación y la oxigenación en la adaptación pulmonar tras el nacimiento	19
I.III.2 Alteraciones de la ventilación y oxigenación asociadas a la HPPN	20
<b>I.IV. REGULACIÓN DEL TONO DEL MUSCULO LISO VASCULAR</b>	21
I.IV.1 Activación de la contracción y la relajación del músculo liso vascular	21
I.IV.2 Acoplamiento excitación-contracción	23
I.IV.3 Cambios en la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el $Ca^{2+}$	25
<b>I.V. MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR PULMONAR Y SU PAPEL EN LA TRANSICIÓN DE LA CIRCULACIÓN PULMONAR FETAL A LA DEL ADULTO</b>	27
I.V.1 Regulación del tono vascular pulmonar por los gases de la respiración	27
I.V.2 Regulación del tono vascular pulmonar por el SNA	28
I.V.3 Regulación del tono vascular pulmonar por mediadores vasoactivos:	29
I.V.3.1 Eicosanoides	29
I.V.3.2 Endotelinas	31
I.V.3.3 Óxido nítrico	33
<b>I.VI. PAPEL DE LOS CANALES DE <math>K^{+}</math> ATP-DEPENDIENTES (<math>K_{ATP}</math>) EN LA RELAJACIÓN DEL MUSCULO LISO VASCULAR</b>	36
I.VI.1 Canales de potasio: papel sobre el potencial de membrana, estructura y tipos	36
I.VI.2 Canales $K_{ATP}$	37
I.VI.3 Agonistas e inhibidores de canales $K_{ATP}$	37
I.VI.4 Papel de los canales de potasio en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto	39
I.VI.5 Papel de los canales de potasio en la HPPN	40

<b>I.VII. PAPEL DE LA ATPASA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> EN LA RELAJACIÓN DEL MUSCULO LISO VASCULAR</b>	<b>41</b>
I.VII.1 Características e importancia fisiológica de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	41
I.VII.2 Regulación de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	42
I.VII.3 Papel de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> en la VPH y en la hipertensión pulmonar	42
<b>I.VIII. TRATAMIENTO DE LA HPPN</b>	<b>44</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>48</b>
<b>III.I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>49</b>
<b>III.II. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS</b>	<b>49</b>
<b>III.III. TÉCNICAS EMPLEADAS</b>	<b>49</b>
III.III.1 Registro de contractilidad en arterias pulmonares y mesentéricas aisladas	49
III.III.1 Registro simultáneo de contractilidad y [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> por fluorimetría	50
<b>III.IV. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES</b>	<b>51</b>
III.IV.1 Ausencia de endotelio	51
III.IV.2 Vasodilatación inducida por NPS y S-nitroso N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619	52
III.IV.3 Reducción de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y fuerza contráctil inducida por NPS en arterias pulmonares de lechón contraídas con NA y U46619	52
III.IV.4 Estudio de diversos pretratamientos sobre la vasodilatación inducida por el NPS y el SNAP en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón	52
III.IV.5 Estudio de la interacción del U46619 con la vía del NO/GMPc en arterias pulmonares de	53
III.IV.6 Estudio de la vasodilatación inducida por levcromakalim, nicorandil y verapamil en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619	53
III.IV.7 Estudio de la vasodilatación inducida por NPS, levcromakalim y nicorandil	53
III.IV.8 Estudio de la vasodilatación inducida por la combinación de NPS y levcromakalim	53

III.IV.9 Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en una solución 0K <sup>+</sup>	55
III.IV.10 Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación y la reducción de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> inducidas por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en una solución 0K <sup>+</sup>	56
III.V. FÁRMACOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS	56
III.VI. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	57
<b>IV. RESULTADOS</b>	58
IV.I. VASODILATACIÓN INDUCIDA POR NPS Y SNAP EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN CONTRAÍDAS CON NA Y U46619	59
IV.II. REDUCCIÓN DE LA [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Y DE LA FUERZA CONTRÁCTIL INDUCIDA POR NPS EN ARTERIAS PULMONARES DE LECHÓN CONTRAÍDAS CON NA Y U46619	61
IV.III. ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RELAJACIÓN PRODUCIDA POR EL NPS Y EL SNAP EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN	65
IV.IV. MECANISMO DE LA INTERACCIÓN DEL U46619 CON LA VÍA NO/GMPC EN ARTERIAS PULMONARES	71
IV.V. VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LEVCROMAKALIM, NICORANDIL Y VERAPAMIL EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN CONTRAÍDAS CON NA Y U46619	73
IV.VI. EFECTOS DE ODQ, GLIBENCLAMIDA O DE AMBOS FÁRMACOS SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR NPS, LEVCROMAKALIM Y NICORANDIL	75
IV.VII. EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE NPS Y LEVCROMAKALIM	79
IV.VIII. EFECTOS DE NA, U46619, ET-1 Y PMA SOBRE LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR EL KCl EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS INCUBADAS EN UNA SOLUCIÓN 0K <sup>+</sup>	83

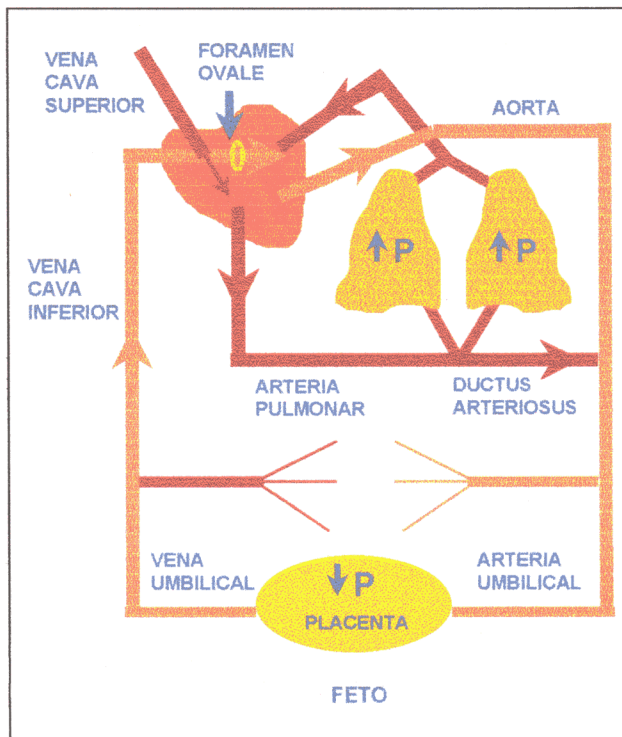
---

IV.IX. EFECTOS DE NA, U46619, ET-1 Y PMA SOBRE LA VASODILATACIÓN Y LA REDUCCIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDA POR EL KCl EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS INCUBADAS EN UNA SOLUCIÓN $0K^+$	94
<b>V. DISCUSIÓN</b>	102
V.I. ESTUDIO DE LA VÍA DE VASODILATACIÓN DEL NO/GMPC EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN	103
V.I.1 Relajación inducida por la vía del NO/GMPC dependiendo del tipo de arteria y del agente vasoconstrictor	103
V.I.2 Mecanismo de la relajación de la vía NO/GMPC en arterias pulmonares y mesentéricas	104
V.I.3 Mecanismo de la interacción del U46619 y la vía del NO/GMPC en arterias pulmonares	105
V.II. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS CANALES $K_{ATP}$ EN ARTERIAS PULMONARES Y MESENTÉRICAS DE LECHÓN	106
V.III. COMBINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL NO/GMPC Y DE LOS CANALES $K_{ATP}$ EN ARTERIAS PULMONARES	108
V.III.1 Relajación inducida por la combinación de NPS y levcromakalim	108
V.III.2 Relajación inducida por el nicorandil	108
V.IV. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA ATPASA $Na^+/K^+$	110
V.IV.1 Vasodilatación inducida por el KCl en arterias incubadas en una solución $0K^+$	110
V.IV.2 Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación inducida por KCl	111
V.IV.3 Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y fuerza contráctil inducidos por KCl	112
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	116
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	119

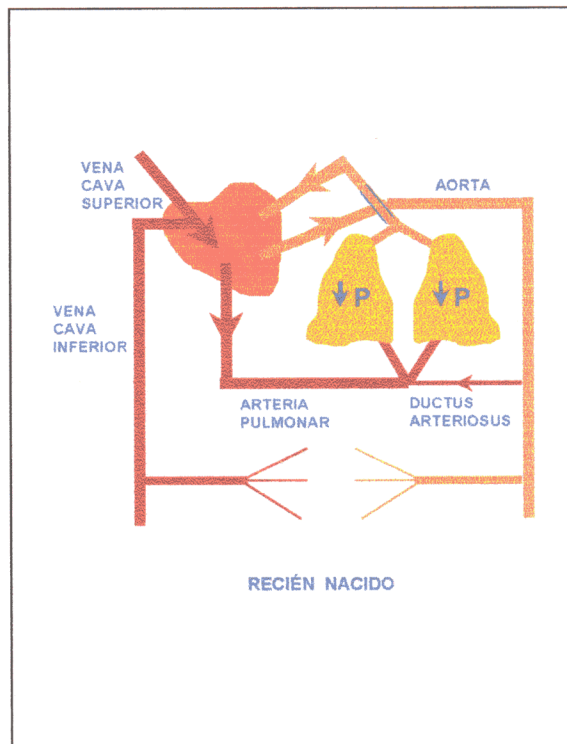
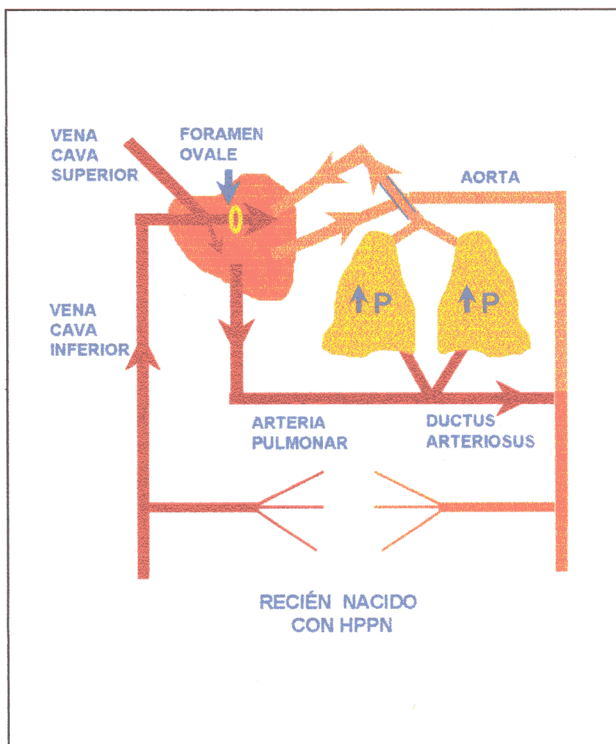
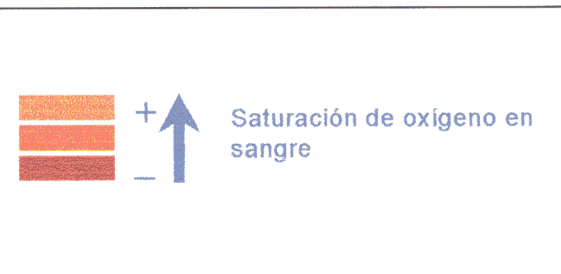
# ***I. INTRODUCCIÓN***

Durante la vida fetal, los pulmones no son funcionales y la placenta es la responsable de llevar a cabo el intercambio gaseoso. La circulación pulmonar fetal ofrece una alta resistencia al flujo sanguíneo y por ello, los pulmones fetales, a diferencia de los del adulto, se caracterizan por una elevada presión arterial y un reducido flujo sanguíneo (35 ml/min/kg en el feto de oveja a término). Antes del nacimiento, la sangre de la placenta (saturación de  $O_2 \approx 80\%$ ) vuelve al feto por la vena umbilical, desde donde pasa al conducto venoso. Éste contacta con la vena cava inferior que contiene sangre desaturada procedente de las extremidades inferiores, pasa a la aurícula derecha y a través del *foramen ovale*, a la aurícula izquierda, al ventrículo izquierdo y, finalmente, a la aorta (Fig 1). La sangre desaturada, que proviene de la cabeza y de los miembros superiores, llega por la vena cava superior, pasa al ventrículo derecho y a la arteria pulmonar. Sin embargo, dado que la resistencia de los vasos pulmonares es alta, un 70% se desvía a la aorta descendente a través del *ductus arteriosus* y el 30% restante pasa a través de la circulación pulmonar a la aurícula izquierda y a la aorta (Reuss y Rudolph, 1980; Teitel y cols., 1987). En efecto, la circulación pulmonar fetal es un circuito de alta resistencia debido a la compresión y acodamiento de las arteriolas y capilares por falta de expansión pulmonar, a la hipertrofia de la capa media de las arteriolas, al estado incipiente de desarrollo pulmonar y a la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Desde la aorta, la sangre se dirige a la placenta por las dos arterias umbilicales, donde la saturación de  $O_2$  es de  $\approx 58\%$  (Fig 1).

Los tres acontecimientos más importantes que tienen lugar en el momento del nacimiento para adaptarse a la vida extrauterina son: a) la ventilación o distensión gaseosa rítmica de los pulmones, b) la oxigenación y c) la supresión de la circulación umbilico-placentaria tras la ligadura de los vasos umbilicales. Tras el nacimiento, los pulmones se expanden al llenarse de aire y el aumento de  $O_2$  alveolar y arterial produce una marcada disminución de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) y de la presión pulmonar; como consecuencia, el flujo sanguíneo pulmonar aumenta unas 8-10 veces, lo que facilita el intercambio gaseoso (Fineman y cols., 1995; Morin y Stenmark, 1995; Teitel y cols., 1990). Además, la supresión del flujo sanguíneo placentario reduce tanto la llegada de sangre a la aurícula derecha como la presión de la misma y produce un aumento de las resistencias vasculares periféricas y una elevación de la presión aórtica muy por encima de la presión pulmonar, lo que conduce al cierre del *ductus arteriosus*. El aumento del flujo sanguíneo pulmonar conlleva un incremento del retorno venoso pulmonar y, por tanto, de la presión auricular izquierda, que alcanza valores superiores a los de la presión auricular derecha, lo que produce el cierre del *foramen ovale*. La presión vascular pulmonar disminuye de forma que a las 24 horas del nacimiento presenta valores de aproximadamente un 50% de la presión arterial sistémica y a las 2-6 semanas se alcanzan los valores propios del adulto (Rudolph, 1985). Además de los efectos mecánicos de la ventilación y del estado de oxigenación, la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto es regulada de forma decisiva por la liberación de mediadores vasoactivos y por cambios en la estructura de la pared vascular.



**Figura 1.** Esquema de la transición de la circulación sanguínea fetal a la del recién nacido sano o con hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN). Obsérvese como la circulación sanguínea en los recién nacidos con HPPN conserva características propias de la del feto.



## I.I. HIPERTENSIÓN PULMONAR PERSISTENTE NEONATAL

Cualquier hecho que perturbe la ordenada transición de la circulación pulmonar del feto a la del adulto produce hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN) (Walsh-Sukys, 1993). Este cuadro afecta a un 0.1-0.5% de los recién nacidos, y es mortal en casi un 40% de los casos (Morin y Stenmark 1995). La HPPN puede ser idiopática o una complicación de diversas alteraciones cardiorrespiratorias del neonato, tales como la enfermedad de membrana hialina, la aspiración meconial, la asfixia neonatal, la sepsis y la hernia diafragmática congénita. A pesar de las diferencias existentes entre estas patologías, todas ellas se caracterizan por la presencia de RVP elevadas tras el nacimiento, lo que conduce a un cortocircuito de derecha a izquierda a través del *ductus arteriosus* y del *foramen ovale* e hipoxemia grave. Esta elevación de las RVP puede ser el resultado de la acción de factores que afectan al tono o a la estructura vascular, o a la combinación de distintos factores como la persistencia de mecanismos fisiológicos que se oponen a la vasodilatación durante la vida fetal, el fallo en la respuesta a estímulos fisiológicos (ventilación y oxigenación) durante el nacimiento o el desbalance entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores.

En esta Introducción se abordan, en primer lugar, las características de la pared vascular pulmonar, los cambios que ésta sufre durante el desarrollo fetal y postnatal hasta obtener su morfología definitiva y las anomalías estructurales asociadas a la HPPN. A continuación, se analizan los principales estímulos que participan en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto y en la génesis de la HPPN, ya sean fisiológicos (ventilación y oxigenación) o mediadores vasoactivos (eicosanoides, endotelinas -ETs y el óxido nítrico -NO). Finalmente, se analizan dos de los principales mecanismos fisiológicos implicados en la regulación del tono vascular pulmonar, la activación de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) y la estimulación de la  $ATPasa Na^+/K^+$ , que pueden ser diana de numerosos mediadores endógenos y desempeñar también un importante papel en la transición pulmonar tras el nacimiento y en el desarrollo de HPPN.

---

## I.II. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

### I.II.1. Características generales de la pared arterial

La pared arterial consta de una capa interna o íntima, una central o media y una más externa denominada adventicia.

#### **La íntima**

Está formada por una monocapa de células endoteliales, que juegan un papel decisivo en el control activo de la circulación, ya que liberan numerosos compuestos vasoactivos. Los principales agentes vasodilatadores liberados por el endotelio son, básicamente, el factor relajante dependiente de endotelio (EDRF), que se ha identificado como óxido nítrico (NO) (Ignarro y cols., 1987a; Palmer y cols., 1987), la prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) o prostaciclina y el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF), cuya identidad es todavía hoy motivo de controversia entre distintos autores (Campbell y cols., 1996; Edwards y cols., 1998; Randall y cols., 1996). El endotelio también libera sustancias vasoconstrictoras, como el factor contracturante dependiente del endotelio, el tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) y la endotelina-1 (ET-1), si bien esta última puede comportarse también como vasodilatadora (Apartado I.V.3.2).

Las células endoteliales descansan sobre una membrana basal, separada de las células musculares lisas por una lámina elástica interna de estructura reticular, que presenta espacios interlaminares, que permiten el paso de sustancias a su través.

#### **La media**

Sus dos principales componentes son las células musculares lisas vasculares (CMLV), que al ser estimuladas se contraen y reducen el diámetro interno de la pared arterial, y la matriz extracelular, que se une a las CMLV, dotándolas de una correcta orientación en la pared vascular. La matriz de la capa media determina, junto con la adventicia, las propiedades mecánicas de la arteria. Elastina y colágeno son los dos componentes proteicos más importantes de la matriz. La elastina dota de elasticidad al vaso y es, por ello, abundante en arterias de conducción, como la aorta. El colágeno permite a la pared de la media mantener su forma, a pesar de la alta presión intraluminal ejercida por la sangre.

#### **La adventicia**

Es la capa más externa de las arterias, separada de la media por una lámina elástica externa. Histológicamente, esta capa contiene colágeno, fibroblastos y algunas CMLV. En arterias de calibre mediano o grande, la adventicia presenta pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*), linfáticos y terminaciones del sistema nervioso autónomo (SNA). En los grandes vasos de conducción, la adventicia es delgada, mientras que en las pequeñas arterias musculares (arterias de resistencia) es más ancha.

### **I.II.2. Características estructurales de las arterias pulmonares**

La circulación pulmonar constituye un circuito de baja presión y baja resistencia que acopla el volumen minuto del ventrículo derecho a la superficie de intercambio gaseoso. Las arterias pulmonares, por ello, son más elásticas y presentan una capa de CMLV mucho más delgada que las arterias sistémicas.

Las arterias pulmonares sufren un cambio en su estructura según se avanza desde la zona más proximal hacia la más distal del vaso. Así, las arterias son elásticas al inicio de cualquier ramificación y pasan, al disminuir su calibre, a una estructura de transición, meramente muscular, parcialmente muscular y no muscular, siendo esta última la que presentan las arterias inmediatamente anteriores al lecho capilar (Hislop y Reid, 1972). Elliot y Reid (1965) describieron como, en el humano adulto, la estructura elástica la presentaban arterias de más de 3000  $\mu\text{m}$  de diámetro (7<sup>a</sup> rama), la estructura de transición las arterias con un diámetro entre 2000 y 3000  $\mu\text{m}$  (7<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> rama) y la estructura muscular las que presentan un diámetro entre 150 y 2000  $\mu\text{m}$  (desde la 9<sup>a</sup> rama hasta la región alveolar). Las arterias parcialmente musculares y no musculares se localizan a nivel alveolar y presentan diámetros inferiores a 150  $\mu\text{m}$ .

El lecho arterial pulmonar puede sufrir cambios importantes en su arquitectura durante el crecimiento fetal y postnatal (Reid, 1989), así como en distintas situaciones patológicas; por ejemplo, un aumento crónico de la presión arterial pulmonar (Barnes y Liu, 1995). A continuación pasamos a describir estos cambios estructurales.

### **I.II.3. Desarrollo de las arterias pulmonares en el feto**

A las 4 semanas de gestación surgen del esófago un par de esbozos pulmonares endodérmicos rodeados de mesénquima, el cual presenta redes vasculares que provienen de la parte anterior del tubo digestivo. Estos vasos crecen siguiendo las ramificaciones de las vías respiratorias y, tras diferenciarse en arterias, se unen a las arterias pulmonares, que han crecido hacia el primordio pulmonar desde el sexto arco aórtico (Adamson, 1991; Morin y Stenmark, 1995). La ramificación y crecimiento de las vías respiratorias y de las arterias se realiza en íntima sincronía, por lo que su desarrollo parece responder a mediadores comunes (Hislop y Reid, 1977). A las 16 semanas de gestación se hayan presentes todas las ramas bronquiales con sus respectivas arterias pre-acinares. En los meses posteriores de vida fetal tiene lugar la formación de estructuras intra-acinares y sus arterias correspondientes (Hislop y Reid, 1972).

En el desarrollo de la vasculatura pulmonar intervienen dos procesos morfológicos: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los vasos sanguíneos primitivos o inmaduros a partir de la diferenciación y segregación de los angioblastos del tejido mesodérmico (precursores de las células endoteliales) (Sabin, 1917; Risau y cols., 1988). Posteriormente, los angioblastos se diferencian en células endoteliales y

contribuyen a la expresión de CMLV, formando un vaso arterial o venoso. La angiogénesis supone la creación de nuevos capilares a partir de la expansión o crecimiento de vasos primitivos pre-existentes (Poole y Coffin, 1989; Zetter, 1988). El proceso angiogénico no es exclusivo del desarrollo fetal, sino que también tiene lugar, por ejemplo, durante el desarrollo del cuerpo lúteo, la hipertrofia muscular que sigue a la práctica regular de ejercicio físico y la cicatrización de heridas.

El crecimiento vascular pulmonar se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales y de las CMLV, así como por un cambio en el fenotipo de estas últimas. Las CMLV del recién nacido presentan una menor expresión de proteínas implicadas en la respuesta contráctil que las del adulto, de forma que al madurar pasan de poseer un fenotipo sintético a uno con mayor capacidad contráctil (Rabinovitch, 1992; Morin y Stenmark, 1995). El hecho de que la CLMV del recién nacido presente un fenotipo sintético explicaría la rápida respuesta hiperplásica observada en la pared arterial pulmonar en condiciones patológicas.

### **I.II.4. Adaptación estructural de la vasculatura pulmonar tras el nacimiento**

Al final del desarrollo fetal, las arterias más proximales (pre-acinares) y aquéllas localizadas a nivel terminal de los bronquiolos son musculares o parcialmente musculares y de pared gruesa, mientras que las arterias intra-acinares carecen de músculo liso. Tras el nacimiento, la vasculatura pulmonar sufre un rápido remodelado vascular, que facilita la brusca reducción de las RVP. Estos cambios estructurales, que presentan características y cursos temporales similares en el hombre y en el cerdo (aunque se producen de forma más rápida en este último), siguen tres fases (Haworth y Hislop, 1981; Rabinovitch, 1992):

**Fase I.** Este período abarca los primeros 4 días de vida y constituye la adaptación inmediata a la vida extrauterina. Los cambios estructurales más drásticos y tempranos se producen en las arterias más periféricas o precapilares, compuestas únicamente de células endoteliales rodeadas de pericitos (Hall y Haworth, 1986). Las células endoteliales del recién nacido no son totalmente planas, se superponen sobre las vecinas y presentan proyecciones superficiales. A los 5 minutos de nacer, las células endoteliales son ya más finas, gradualmente van dejando de superponerse (aumenta la relación superficie-volumen y disminuye el número de proyecciones) y se extienden a lo largo de la pared vascular; sin embargo, la cantidad de músculo liso vascular pulmonar no se modifica (Haworth, 1988). Por lo tanto, las paredes vasculares adelgazan, al tiempo que el diámetro interno vascular aumenta. Estos cambios se acompañan del reclutamiento de las arterias no musculares y de la vasodilatación de las arterias parcialmente musculares del terminal bronquial (arterias de resistencia), que estaban previamente cerradas. El resultado final de todos estos procesos es la brusca reducción de las RVP, que ocurre inmediatamente después del nacimiento (Haworth y Hislop, 1981).

**Fase II.** Se extiende hasta las 3-4 semanas de vida y se caracteriza por una reducción de la cantidad de músculo liso en las arterias pulmonares de  $< 250 \mu\text{m}$  de diámetro y la aparición de una lámina interna elástica muy fenestrada, que permite el contacto entre las células

endoteliales y las CMLV. Estos cambios conllevan un aumento del diámetro interno vascular y una reducción de las RVP (Haworth y Hislop, 1981).

**Fase III.** A partir de las 2 semanas comienza a reaparecer el músculo liso en el acino. Según pasan los días, las CMLV aumentan en tamaño y número y se deposita tejido conectivo (elastina, colágeno), dando lugar a la nueva estructura de la pared vascular pulmonar, adaptada a la presencia de un circuito de baja presión y baja resistencia. Esta fase se prolonga hasta que las CMLV alcanzan su madurez estructural, es decir, hasta por lo menos los 2 años de vida en el hombre y los 6 meses en el cerdo (Haworth, 1988).

#### **I.II.5. Anomalías estructurales asociadas a la HPPN**

Una incorrecta adaptación estructural de la vasculatura pulmonar tras el nacimiento puede conducir al desarrollo de HPPN. Geggel y Reid (1984) y Rabinovitch (1989) clasificaron la HPPN en base a anomalías estructurales del pulmón y del músculo liso vascular en tres subgrupos: 1) por *subdesarrollo* de la circulación pulmonar, que cursa con una disminución importante del número de vasos distales (hipoplasia) y de alvéolos (p.ej. hernia diafragmática congénita), 2) por *mal desarrollo*, que se caracteriza por una "muscularización" excesiva de las arterias pulmonares, que puede ser consecuencia de un daño intrauterino o perinatal (p.ej. aspiración meconial). En el término "muscularización" se incluyen el engrosamiento de la media y de la adventicia, el acúmulo excesivo de matriz extracelular y la extensión de las CMLV hacia las arterias de menor calibre (p.ej. intra-acinares), 3) por *mala adaptación*, cuando aunque el desarrollo estructural haya sido normal, existe una deficiente respuesta a mediadores vasodilatadores que impide la vasodilatación apropiada tras el nacimiento.

### I.III. VENTILACIÓN Y OXIGENACIÓN PULMONAR

#### I.III.1 Papel de la ventilación y la oxigenación en la adaptación pulmonar tras el nacimiento

La ventilación y la oxigenación son los dos mecanismos fisiológicos responsables de la vasodilatación y del aumento del flujo sanguíneo pulmonar, que siguen al nacimiento. Ambos procesos son capaces de aumentar el flujo sanguíneo pulmonar de forma independiente (Rabinovitch, 1992). Así, la ventilación pulmonar, por sí sola, es responsable de hasta un 75 % del aumento del flujo sanguíneo pulmonar que sigue al nacimiento (Teitel y cols., 1990; Reid y Thornburg, 1990); por otro lado, la oxigenación, incluso en condiciones experimentales carentes de ventilación pulmonar, también disminuye las RVP fetales (Cassin y cols., 1964; Assali y cols., 1968). De cualquier modo, la acción conjunta de ambos mecanismos sobre la reducción de las RVP es mucho mayor que la inducida por cada proceso por separado (Cassin y cols., 1964; Teitel y cols., 1990).

La caída de las RVP, que ocurre normalmente cuando los pulmones fetales son ventilados, presenta dos fases: la primera abarca los primeros 30-60 segundos tras el nacimiento y la segunda se extiende durante los 10-20 minutos posteriores. En la primera tiene lugar el establecimiento de la interfase gas-líquido a nivel alveolar, lo que disminuye la presión perivascular, distiende las pequeñas arteriolas y reduce las RVP, mientras que la segunda parece deberse a un aumento de la producción de las prostaglandinas vasodilatadoras (fundamentalmente PGI<sub>2</sub>) (Heymann, 1989; Teitel y cols., 1990).

El tono vascular pulmonar es regulado por los gases que intervienen en la respiración (ver apartado I.V.1). Tanto la presión parcial de O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) como la de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) juegan un papel importante en la regulación de las RVP y del flujo sanguíneo pulmonar durante los períodos pre y postnatal. La hipoxia y la hipercapnia están involucradas en el mantenimiento de RVP elevadas característico de la vida fetal (Rudolph y Yuan, 1966). Además, el aumento de la pO<sub>2</sub> y la disminución de la pCO<sub>2</sub> reducen las RVP, aumentan el flujo sanguíneo pulmonar y son responsables de la transición de la circulación fetal a la del adulto (Heyman, 1989; Morin y cols., 1988).

A pesar de que tanto la ventilación como la oxigenación producen efectos directos sobre el tono vascular pulmonar, también pueden actuar de forma indirecta a través de la liberación o producción local de sustancias vasoactivas. Así, como se ha indicado anteriormente, la ventilación pulmonar produce, en parte, sus efectos a través de la liberación de PGI<sub>2</sub> (Gryglewski, 1980; Leffler, 1984a). El aumento de la liberación de NO por las células endoteliales y la activación de los canales de K<sup>+</sup> también han sido implicados en la relajación postnatal inducida por la ventilación (Cornfield y cols., 1992; Tristani-Firouzi y cols., 1996) y la oxigenación pulmonar (Cornfield y cols., 1992; Cornfield y cols., 1996; Tikitski y Morin, 1993; Shaul y cols., 1992).

### **I.III.2. Alteraciones de la ventilación y la oxigenación en la HPPN**

La hipoxia intrauterina o en los primeros momentos de vida extrauterina puede prevenir la vasodilatación arterial pulmonar característica del recién nacido. De hecho, la hipoxia produce un marcado aumento de las RVP y un cuadro de hipertensión pulmonar asociado a una marcada proliferación de las capas media y adventicia (Rabinovitch, 1992). La aspiración meconial y el síndrome de disfunción respiratoria son dos situaciones que pueden conducir a una HPPN. Ambas situaciones parecen ser consecuencia de una deficiente ventilación y oxigenación pulmonar tras el nacimiento, secundaria a una obstrucción de las vías respiratorias o a atelectasia (Morin y Stenmark, 1995).

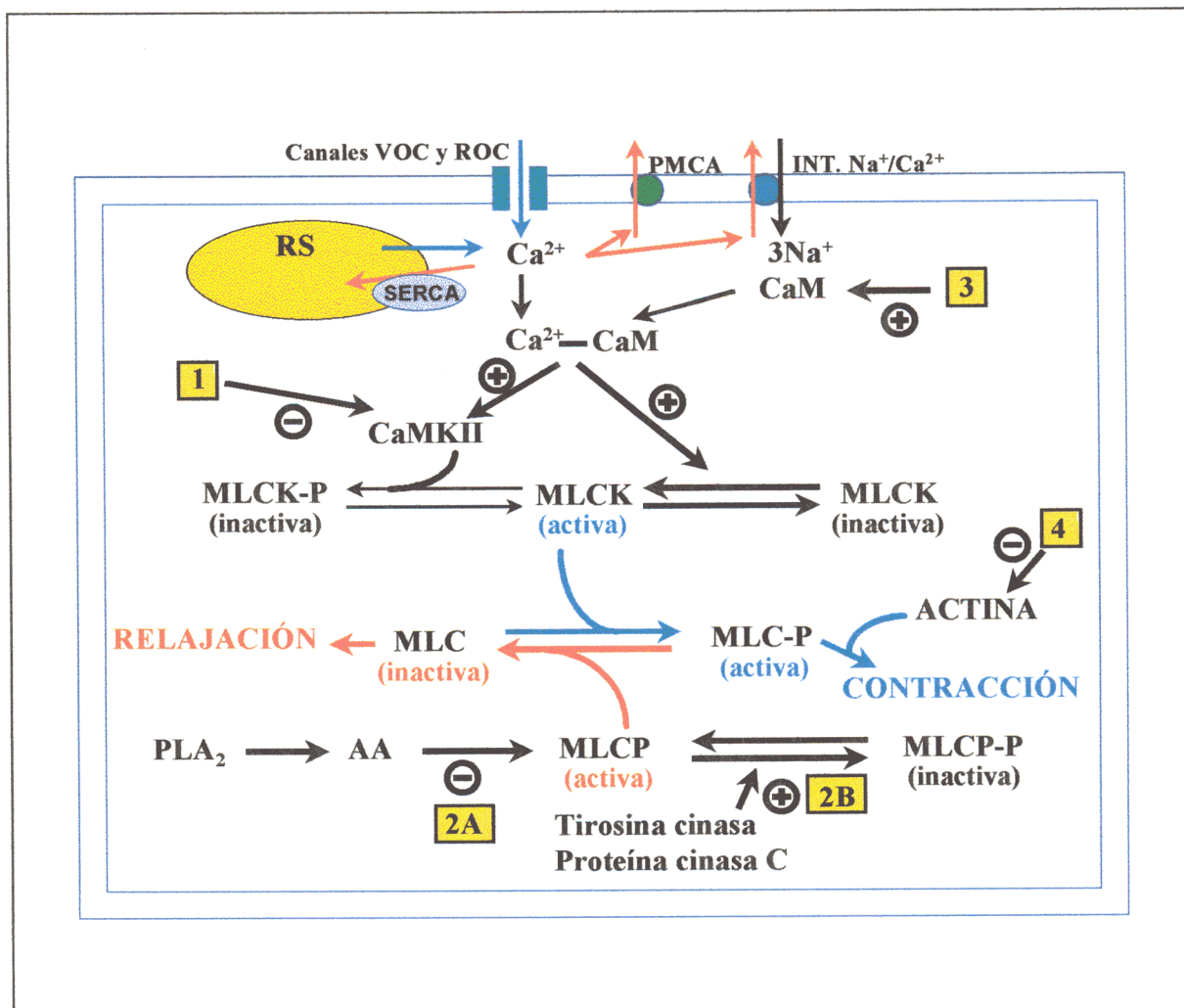
## I.IV. REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

### I.IV.1 Activación de la contracción y la relajación del músculo liso vascular

El aumento o la reducción de la concentración de calcio libre intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), son los principales mecanismos que inician la contracción y la relajación del músculo liso vascular, respectivamente.

Factores físicos (estiramiento, presión, cizallamiento), agonistas y factores de crecimiento aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  desde 0.1 a 0.6-0.8  $\mu M$  y generan una respuesta contráctil en las CMLV. El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es el resultado de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de canales de la membrana celular y/o de su liberación desde sus depósitos intracelulares, fundamentalmente del retículo sarcoplásmico (RS) (Fig 2). Cuando aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$ , éste se fija a la calmodulina (CaM) (se unen 4 iones  $Ca^{2+}$  por cada molécula de calmodulina), formándose el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina ( $Ca^{2+}$ -CaM), el cual se une a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), dando lugar al complejo activo  $Ca^{2+}$ -CaM-MLCK (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993). Una vez activada, la MLCK induce la fosforilación de la serina en posición 19 de la cadena ligera (20 kD) de la miosina ( $MLC_{20}$ ). Esta fosforilación permite la unión de la actina y la activación de la ATPasa de la miosina, lo que facilita el establecimiento de los puentes cruzados entre ambas proteínas y el desarrollo de fuerza o acortamiento del músculo liso vascular (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993) (Fig 2).

La relajación de la CMLV tiene lugar cuando disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$  a nivel de las proteínas contráctiles. Esta disminución conlleva la disociación del complejo  $Ca^{2+}$ -CaM-MLCK y la regeneración de la apoenzima (MLCK) inactiva, lo que permite la defosforilación de la  $MLC_{20}$  a través de la fosfatasa de la MLC (MLCP), produciéndose la relajación muscular (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993) (Fig 2). La reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  es el resultado de la activación de dos ATPasas activadas por el  $Ca^{2+}$ , localizadas en la membrana celular (PMCA) y en el RS (SERCA) y del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Fig 2). Estas dos ATPasas pueden ser reguladas mediante la fosforilación inducida por las proteínas cinasas C (PKC), A (PKA) y G (PKG); además, la PMCA se activa por la CaM, mientras que la SERCA se regula por el grado de fosforilación de una proteína denominada fosfolambano. El intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  presenta una baja afinidad por el  $Ca^{2+}$  y su acción parece estar limitada a aumentos locales de la  $[Ca^{2+}]_i$  a nivel submembranoso.



**Figura 2.** Esquema de la regulación de la contracción y la vasodilatación por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Las flechas en color azul y rojo muestran los principales mecanismos de aumento y reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; y los últimos pasos que conducen a la contracción y la relajación, respectivamente. Los cuadrados con fondo amarillo señalan los posibles mecanismos implicados en la sensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por los agonistas: 1) La formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM podría activar no sólo la MLCK, sino también a otra proteína quinasa, la calmodulina quinasa II (CaMKII), encargada de la fosforilación e inactivación de la MLCK (Tansey y cols., 1992). Los agonistas podrían, de algún modo, inhibir la CaMKII, con lo que se mantendrían los niveles de MLCK activa. 2) La inhibición de la MLCP a través de dos mecanismos: a) La activación de la fosfolipasa  $A_2$  y posterior producción del ácido araquidónico (AA), el cual inhibe directamente esta fosfatasa en su forma activa (Gong y cols., 1992; 1995). b) La activación de la PKC y de la tirosina quinasa que pueden fosforilar la MLCP, produciendo su inactivación (Itoh y cols., 1993; Masuo y cols., 1994). 3) Un aumento de la disponibilidad de calmodulina (Luby-Phelps y cols., 1995). 4) La activación de la actina independientemente de la fosforilación de la MLC (Hori y cols., 1992; Sato y cols., 1992).

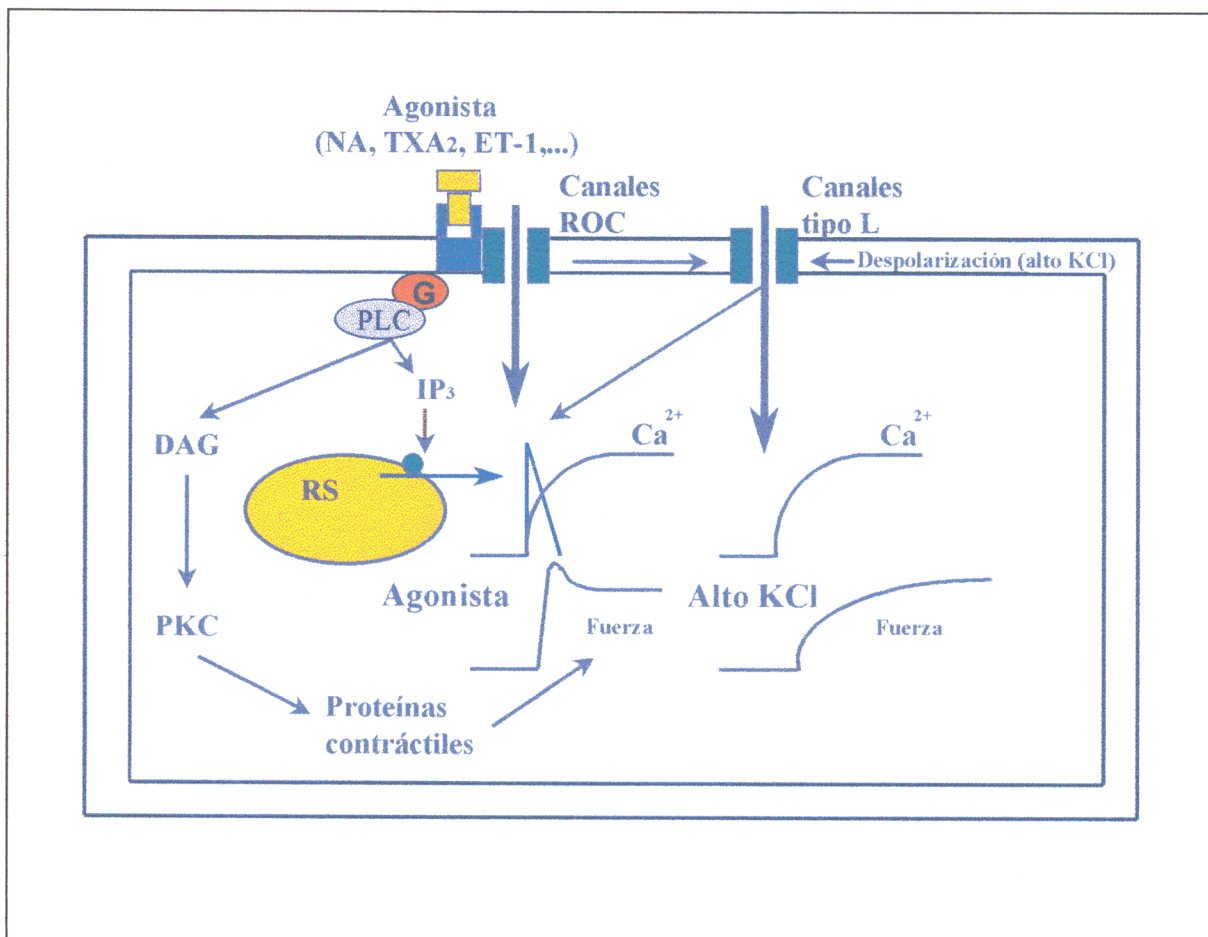
## I.IV.2. Acoplamiento excitación-contracción

El acoplamiento excitación-contracción implica una cadena de procesos en la que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  juega un papel primordial. Se han descrito dos tipos de acoplamiento excitación-contracción dependiendo de si el estímulo es la despolarización de la membrana (acoplamiento electromecánico) o la acción de agonistas (acoplamiento farmacomecánico) (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993).

El *acoplamiento electromecánico* implica cambios en el potencial de membrana de la CMLV. El potencial de reposo de las CMLV varía entre -50 y -60 mV; cuando estos valores se vuelven menos negativos (despolarización) se activan-abren los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VOC), produciéndose la entrada de  $Ca^{2+}$ , el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción muscular (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993; Himpens y cols., 1995). De los dos principales canales VOC, el tipo L y el tipo T, el primero, tanto por su alta conductancia (18-24 pS) como por su umbral de activación (-40 mV), parece ser el principal responsable de la entrada de  $Ca^{2+}$  durante el acoplamiento electromecánico. La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo L parece ser la responsable del componente tónico de la contracción durante una despolarización mantenida de la membrana celular (p.ej. tras aumentar la concentración de  $K^+$  extracelular,  $[K^+]_o$ ) (Fig 3). La corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  activada durante la despolarización puede poner en marcha el mecanismo que se conoce como *liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$* , que consiste en la activación por parte del  $Ca^{2+}$  de los receptores de rianodina del RS y la consiguiente liberación de  $Ca^{2+}$  del RS (Iino, 1989; Somlyo y cols., 1991). Aunque este mecanismo juega un importante papel en el músculo cardíaco, su existencia en el músculo liso vascular es todavía motivo de controversia (Horowitz y cols., 1996). Los cambios del potencial de membrana hacia valores más negativos (hiperpolarización) producen el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo VOC y disminuyen la  $[Ca^{2+}]_i$ , produciendo vasodilatación. La apertura de canales de  $K^+$  y la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  son dos de los principales mecanismos responsables de la hiperpolarización de la membrana de las CMLV, como se detalla en los apartados I.VI y I.VII, respectivamente.

El *acoplamiento farmacomecánico* engloba una serie de mecanismos de señalización celular, que pueden estimular la contracción o la relajación vascular sin modificar el potencial de membrana de la CMLV (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993). Esta activación también se asocia a un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  procedente, en parte, del medio extracelular pero, fundamentalmente, del RS (Fig 3). El RS es el principal depósito intracelular de  $Ca^{2+}$  en las CMLV. Presenta en su membrana receptores para el inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) que, al activarse, permiten la salida masiva de  $Ca^{2+}$ . El  $IP_3$  se genera por distintos agonistas, tales como acetilcolina (ACh), angiotensina II (A-II), vasopresina, histamina, serotonina (5-HT), ET-1, catecolaminas y  $TXA_2$ , que actúan sobre sus receptores específicos de la membrana celular, que están acoplados a la fosfolipasa C a través de las subunidades  $\alpha$  de la proteína Gq (Himpens y cols., 1995; Karaki y cols., 1997; Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993). La fosfolipasa C hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ), siendo el  $IP_3$  uno de los productos de la reacción.

Van Breemen y cols. (1995) sugirieron que el RS se comporta como una barrera amortiguadora (*buffer barrier*) del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula. Según estos autores, el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula se acumularía en un *espacio submembranoso restringido*, donde sería parcialmente secuestrado por el RS, lo que impediría su paso al *espacio citoplasmático central*, que alberga los elementos contráctiles responsables de la contracción. Este proceso puede ser modulado por distintos agentes. Los vasodilatadores, que aumentan los niveles de los nucleótidos cíclicos, incrementarían la capacidad amortiguadora del RS y disminuirían el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio citoplasmático central, mientras que los vasoconstrictores aumentarían los niveles de  $\text{IP}_3$  y reducirían la barrera amortiguadora, aumentando el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio citoplasmático central. Este aumento de  $\text{IP}_3$  sería de especial importancia a nivel del denominado "junction space", o zona donde el RS y la membrana plasmática están más íntimamente acoplados. A este nivel el  $\text{IP}_3$  activaría sus receptores específicos localizados en la superficie del RS, que forman un canal iónico a través del cual sale el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RS; el resultado es un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; a nivel de las proteínas contráctiles y un aumento del tono vascular.



**Figura 3.** Esquema de los mecanismos que intervienen en el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en el desarrollo de la fuerza contráctil inducidos por la despolarización o la acción de un agonista.

Los agonistas pueden, además, inducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Nelson y cols., 1988; Ohya y Sperelakis, 1991) o de los canales activados por receptor (ROC) (Benhan y Tsien, 1987; Ganitkevich e Isenberg, 1990) (Fig 3). Los canales ROC también parecen activarse por el estiramiento mecánico (Davis y cols., 1992), si bien se han descrito canales que responden específicamente a estímulos físicos y son sensibles al bloqueo con gadolinio (Karakı y cols., 1997).

Las características de la respuesta contráctil dependen, por tanto, del tipo de estímulo (despolarización o agonista) y de la fuente responsable del aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig 3). Altas concentraciones de  $\text{K}^+$  extracelular producen despolarización de la membrana, aumentan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo L y producen una contracción mantenida, que puede suprimirse por los bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Sato y cols., 1988; Karaki y cols., 1991). Por el contrario, agonistas como la noradrenalina (NA) por un lado estimulan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS, lo que produce una respuesta contráctil transitoria, ya que la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS es limitada (Karakı y cols., 1997), y por otro aumentan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y tipo ROC, produciendo una contracción mantenida (Karakı y cols., 1997).

### I.IV.3. Cambios en la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el $\text{Ca}^{2+}$

Como se ha indicado, la activación de la MLCK dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la posterior fosforilación de la MLC genera una respuesta contráctil (fuerza). Sin embargo, la utilización de marcadores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (p.ej. aequorina, fura-2) ha permitido demostrar que la relación fuerza- $\text{Ca}^{2+}$  puede ser variable, lo que sugiere la existencia de procesos de sensibilización o desensibilización de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Sensibilización.* Una disociación entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la fuerza contráctil desarrollada se ha observado en presencia de los ésteres de forbol (Sato y cols., 1992) y de distintos agonistas tales como: la NA (Karakı y cols., 1988a; Sato y cols., 1988; Himpens y cols., 1990; Hori y cols., 1992), la ET-1 (Hori y cols., 1992; Sudjarwo y cols., 1995; Karaki y Matsuda, 1996), el U46619, un agonista de los receptores del  $\text{TXA}_2$  (Himpens y cols., 1990) y la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Balwierczak, 1991; Hori y cols., 1992). Todos estos agonistas inducen una mayor respuesta contráctil que el KCl, a pesar de producir aumentos similares, o incluso menores, de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo que sugiere que son capaces de producir sensibilización de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$ . Se han propuesto hasta 4 mecanismos diferentes por los que los agonistas podrían sensibilizar a las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  (Karakı y cols., 1997) (Fig 2).

*Desensibilización.* Los aumentos de los niveles de AMPc producido por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y de GMPc producido por el NO o los dadores de NO conducen a la vasodilatación de la CMLV. A pesar de que estos agentes disminuyen la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la relajación producida es mayor de la que correspondería a esta reducción (Rembold, 1992; Salomone y cols., 1995; Abe y Karaki, 1989; Karaki y cols., 1988b); es decir, que estos agentes pueden inducir la desensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Los nucleótidos cíclicos

parecen aumentar la  $[Ca^{2+}]$ , requerida para fosforilar la MLC, bien por inhibir la MLCK, por activar la MLCP o a través de mecanismos independientes de la fosforilación de la MLC (Itoh y cols., 1993; Kitazawa y cols., 1996; Karaki y cols., 1997).

## **I.V. MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR PULMONAR Y SU PAPEL EN LA TRANSICIÓN DE LA CIRCULACIÓN PULMONAR FETAL A LA DEL ADULTO**

La circulación pulmonar es regulada básicamente por factores activos y pasivos (Daly y Hebb, 1966). Entre los factores pasivos se encuentran: el volumen minuto cardíaco, la presión de la aurícula izquierda, la presión de las vías aéreas y del líquido intersticial, la fuerza de gravedad y la obstrucción de las vías aéreas. Todos estos factores modifican las resistencias vasculares periféricas independientemente de cambios en el tono vascular. Los factores activos incluyen los gases de la respiración, el sistema nervioso autónomo (SNA) y los mediadores vasoactivos (Barnes y Liu, 1995); todos estos factores alteran las RVP por modificar el tono del músculo liso pulmonar. Aunque los factores pasivos puedan ser importantes en algunas circunstancias, la circulación pulmonar es regulada fundamentalmente por los factores activos, especialmente en situaciones patológicas (Barer, 1980).

### **I.V.1. Regulación del tono vascular pulmonar por los gases de la respiración**

El tono vascular pulmonar está determinado por los gases que intervienen en la respiración. La disminución de la  $pO_2$  y el aumento de la  $pCO_2$  son los responsables de la respuesta vasomotora pulmonar a la hipoxia e hipercapnia, respectivamente (Duke, 1954; Frishman, 1961; Marshall y Marshall, 1983). La respuesta vascular pulmonar a la hipoxia es muy característica, diferenciándose dos fases. La primera cursa con una respuesta vasoconstrictora conocida como vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), que es una respuesta fisiológica que disminuye la perfusión sanguínea en zonas pobremente ventiladas, redistribuyendo el flujo hacia zonas mejor oxigenadas, optimizando el acoplamiento ventilación-perfusión y, como consecuencia, la oxigenación arterial. En caso de una exposición prolongada a la hipoxia, se observa una segunda fase que se caracteriza por una respuesta vasodilatadora sensible a glibenclamida, un inhibidor de los canales  $K_{ATP}$  (Wiener y cols., 1991). La VPH es, posiblemente, el mecanismo de control activo más poderoso de la circulación pulmonar pero, desgraciadamente, el mecanismo responsable de la misma no es del todo conocido. En este sentido, se ha descrito que la VPH puede ser consecuencia de: a) el cierre de distintos tipos de canales de  $K^+$ , que despolariza la membrana plasmática, facilita la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  tipo VOC, aumenta la  $[Ca]_i$  y produce vasoconstricción pulmonar (Archer y cols., 1993; Barman, 1998; Cornfield y cols., 1994; López-López y cols., 1989; Post y cols., 1992); b) la sensibilización de las proteínas contráctiles al  $Ca^{2+}$  (Robertson y cols., 1995); c) la inhibición de la síntesis endotelial de NO y  $PGI_2$  (Archer y cols., 1989; Liu y cols., 1991b; Villamor y cols., 1997b; Wadsworth, 1994), asociada o no a una mayor síntesis de ETs y leucotrienos (LTs)  $C_4$  ( $LTC_4$ ) y  $D_4$  ( $LTD_4$ ) (Kourembanas y cols, 1990) y d) un acúmulo de células inflamatorias, que favorecen la vasoconstricción y los cambios fibroproliferativos pulmonares (Morin y Stenmark, 1995).

### I.V.2. Regulación del tono vascular pulmonar por el SNA

En 1896 François-Franck observó cómo la estimulación simpática pulmonar producía un aumento de la presión arterial pulmonar y de la frecuencia cardíaca, si bien, estos efectos podrían atribuirse a cambios en el volumen minuto cardíaco o en la presión de las vías respiratorias, que también aparecen durante la estimulación simpática. Posteriormente, se demostró que, en condiciones de flujo sanguíneo constante, la estimulación simpática aumentaba las RVP (Daly y Hebb 1952, Daly y cols., 1970) y la impedancia pulmonar (Pace, 1971). Estos efectos están mediados por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos postsinápticos (Hyman, 1986; Kadowitz y Hyman, 1973); la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos postsinápticos, por su parte, produce vasodilatación pulmonar y su bloqueo aumenta la respuesta vasoconstrictora inducida por la estimulación simpática (Hyman, 1986). También existen receptores  $\alpha_2$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos presinápticos que, respectivamente, disminuyen o aumentan la liberación de NA desde los terminales simpáticos. En niños con HPPN, disminuye la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y se produce un desacoplamiento del receptor  $\beta$ -adrenérgico, que conduce a una menor producción de AMPc y a una menor respuesta vasodilatadora (Barnes y Liu, 1995). En condiciones fisiológicas, la estimulación adrenérgica controla, en parte, el tono vascular pulmonar basal. Así, se ha descrito que la simpatectomía torácica (Kabins y cols., 1962) o el tratamiento con antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Barer, 1966) disminuyen las RVP, mientras que el bloqueo  $\beta_2$ -adrenérgico las aumenta (Murray y cols., 1986) y que tras el autotrasplante pulmonar hay una mayor respuesta a los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Barnes y Liu, 1995).

La inervación colinérgica pulmonar es mucho más pobre que la adrenérgica, y no parece intervenir en el mantenimiento del tono vascular pulmonar (Murray y cols., 1986). Dependiendo de la especie animal, la estimulación vagal puede producir vasodilatación (Rudolph, 1979) o vasoconstricción pulmonar (Daly y Hebb, 1952), ya que el nervio vago en algunas especies, como el perro, presenta fibras nerviosas adrenérgicas. En el cerdo, las arterias intrapulmonares no parecen presentar terminales teñidos por la colino acetiltransferasa, pero sí las venas (Fillenz, 1970). Se ha descrito que la ACh, en el territorio pulmonar, puede producir efectos vasodilatadores (Fritts y cols., 1958; Cherry y Gillis, 1987) mediados a través de la liberación de NO por las células endoteliales (McMahon y cols., 1991) y vasoconstrictores (Catravas y cols., 1984; Sada y cols., 1987), dependiendo del tono vascular pre-existente. Este efecto está mediado a través de la estimulación de receptores muscarínicos  $M_3$  o  $M_4$  del endotelio de los vasos pulmonares, dependiendo de la especie animal (Barnes y Liu, 1995); los receptores  $M_1$  y  $M_2$  se localizan, respectivamente, en los terminales nerviosos simpáticos y parasimpáticos, modulando la liberación de NA y ACh. En arterias pulmonares humanas, la ACh produce un claro efecto vasodilatador, tanto en situaciones fisiológicas como en presencia de vasoconstricción pulmonar hipóxica (Fritts y cols., 1958).

### I.V.3. Regulación del tono vascular pulmonar por mediadores vasoactivos

Existen numerosos mediadores y hormonas que intervienen en la regulación del tono vascular pulmonar y cuyos efectos pueden variar dependiendo de la especie, la edad o el tono pre-existente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales factores vasoactivos implicados en la regulación del tono vascular pulmonar. Clasificación según su acción vasodilatadora, vasoconstrictora o dual.

Acción vasoconstrictora	Acción vasodilatadora	Acción dual
A-II, neuropéptido Y, *PGD <sub>2</sub> , *PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , TXA <sub>2</sub>	AMP, CGRP, PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub> , ANP y VIP	AA, adenosina, ADP, ATP, AVP, BK, ETs, histamina, PAF, 5-HT, sustancia P y trombina

A-II (angiotensina II), AA (ácido araquidónico), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato), ANP (péptido natriurético atrial), ATP (adenosina trifosfato), AVP (arginina vasopresina), BK (bradicinina), CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), ETs (endotelinas), PAF (factor activador plaquetario), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGI<sub>2</sub> (prostaglandinas D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> y prostaciclina), TXA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>), VIP (péptido intestinal vasoactivo) y 5-HT (serotonina). \* Vasodilatador en fetos de cordero.

A pesar de que todos estos mediadores juegan un papel importante en la regulación del tono vascular pulmonar, su papel fisiopatológico en la génesis de la hipertensión pulmonar es bastante incierto (Barnes y Liu, 1995). En cualquier caso, la regulación de la circulación pulmonar fetal y neonatal está determinada por el balance entre agentes vasoconstrictores y vasodilatadores (Heymann, 1989; Kinsella y Abman, 1995). Entre los agentes vasoactivos que intervienen en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto destacan los eicosanoides, las ETs y el NO.

#### I.V.3.1 Eicosanoides

Los eicosanoides son un grupo de potentes sustancias vasoactivas, cuyo origen común es el AA. El AA se libera a partir de los fosfolípidos de la membrana gracias, a la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y se degrada a través de 3 vías metabólicas: a) la de la ciclooxigenasa, que da lugar a prostaglandinas (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> o prostaciclina) y tromboxanos A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), b) la de la lipooxigenasa, que da lugar a los LTs y c) la de la epooxigenasa o del citocromo P450, que da lugar a los ácidos epóxicieicosatrienoicos (Holtzman, 1991).

**Papel de los eicosanoides en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto**

Los eicosanoides juegan un importante papel en la regulación del tono vascular pulmonar perinatal. El propio AA produce vasoconstricción cuando el tono pulmonar es bajo, pero se comporta como vasodilatador cuando el tono se eleva por la hipoxia (Gerber y cols., 1980). Las PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> se comportan como vasodilatadores modestos de la vasculatura pulmonar fetal, mientras que la PGI<sub>2</sub> presenta una acción vasodilatadora mucho más potente y sus niveles plasmáticos aumentan en la circulación pulmonar durante el nacimiento (Leffler y cols., 1984a), siendo, por ello, la que mayor relevancia presenta en la transición de la circulación fetal a la del adulto (Hyman y Kadowitz, 1979). La PGI<sub>2</sub> estimula la síntesis de AMPc y de NO en la CMLV, que a su vez incrementa los niveles de GMPc. El aumento de estos nucleótidos cíclicos y de NO no sólo contribuye a las acciones vasodilatadoras pulmonares de la PGI<sub>2</sub>, sino también a sus acciones antiproliferativas y antiagregantes plaquetarias (Morin y Stenmark, 1995). El papel de la PGI<sub>2</sub> en la adaptación pulmonar al medio extrauterino se ha asociado al componente mecánico (estiramiento) de la ventilación; así, se ha descrito que la ventilación pulmonar fetal, incluso sin modificar la pO<sub>2</sub>, aumenta la producción pulmonar de PGI<sub>2</sub> (Gryglewski, 1980) y de su metabolito el 6-ceto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (Leffler y cols., 1984a). La indometacina o el ácido meclofenámico, que inhiben la síntesis de PGI<sub>2</sub>, facilitan el cierre del *ductus arteriosus* y disminuyen el aumento del flujo sanguíneo pulmonar y la reducción de la RVP que provoca la expansión mecánica pulmonar, pero no modifican los cambios inducidos por la oxigenación en el momento del nacimiento. Además, se han descrito cuadros de HPPN en recién nacidos de madres tratadas con AINEs durante el embarazo (Manchester y cols., 1976). La bradicinina y la A-II, cuya concentración aumenta tras el nacimiento, también estimulan la producción de PGI<sub>2</sub> (Omini y cols., 1983; Leffler y cols., 1984a). La PGD<sub>2</sub> se comporta como vasodilatador pulmonar en fetos de cerdo y en corderos recién nacidos, pero a los diez días de edad actúa como vasoconstrictor (Soifer y cols., 1983; Perreault y cols., 1990). Curiosamente, este doble efecto se ha observado también con la histamina. Ambos, PGD<sub>2</sub> e histamina, se hayan presentes en los mastocitos, cuyo número aumenta al final del nacimiento y disminuye marcadamente tras el mismo. Por lo tanto, sería posible que la ventilación pulmonar indujera la degranulación de mastocitos, liberándose PGD<sub>2</sub> e histamina, que contribuirían a la vasodilatación pulmonar postnatal inicial. Además, la histamina estimula la secreción del PAF, que es también un potente vasodilatador pulmonar, particularmente cuando el tono vascular está elevado (Chen y cols., 1992; Heymann, 1989).

El TXA<sub>2</sub>, la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y los LTs son potentes agentes vasoconstrictores a nivel pulmonar (Barnes y Liu, 1995). Los LTs, parecen participar en el mantenimiento de las RVP elevadas durante el período fetal, ya que se ha descrito que el tratamiento con antagonistas de los receptores de los LTs (Coceani y Olley, 1988) o con inhibidores de la síntesis del LTA<sub>4</sub> (Heymann y cols., 1988) produce un incremento del flujo vascular pulmonar en el período postnatal. El efecto vasoconstrictor de los LTs y del AA parece estar mediado, en parte, a través de la producción del TXA<sub>2</sub> (Soifer y cols., 1989; Buzzard y cols., 1993).

Sin embargo, la importancia de los eicosanoides en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto ha sido cuestionada, ya que sólo unas horas después del nacimiento

disminuye la producción de PGI<sub>2</sub> (Leffler y cols., 1984b) y desaparece al cabo de unos días (Morin, 1986). Además, el aumento de las RVP inducido por los inhibidores de la ciclooxigenasa disminuye rápidamente tras el nacimiento (Redding y cols., 1984). Por todo ello, parece que el papel de los eicosanoides podría limitarse exclusivamente al comienzo de dicha transición.

### **Papel de los eicosanoides en la HPPN**

En lactantes con HPPN se han encontrado niveles elevados de LTs C<sub>4</sub> y D<sub>4</sub> y de TXs (Dobyns y cols., 1994), los cuales incrementan la presión arterial y las RVP en animales recién nacidos (Soifer y cols., 1989); sin embargo, en estas circunstancias, disminuye la eliminación urinaria de PGI<sub>2</sub> (Gaine y Rubin, 1998). Los aumentos de los niveles de TXA<sub>2</sub> y de LTs han sido implicados en la fase aguda de la hipertensión pulmonar inducida por la sepsis o el factor necrótico tumoral (TNF $\alpha$ ) (Kuratomi y cols., 1993; Wheeler y cols., 1992); de hecho, la inhibición de la síntesis de TXA<sub>2</sub> suprime la hipertensión inducida por la sepsis (Runkle y cols., 1984; Truog y cols., 1986; Weitzberg y cols., 1995) y la administración de U46619 reproduce los efectos hemodinámicos observados en esta fase (Brigham y Meyrick, 1986). El TXA<sub>2</sub> ha sido implicado también en otros modelos de hipertensión pulmonar, como la inducida por heparina/protamina (Montalescot y cols., 1990), isquemia-reperusión (Zamora y cols., 1993), LTD<sub>4</sub> (Noonan y Malik, 1986) y microembolismo (García-Szabo y cols., 1988). En pacientes con hipertensión pulmonar secundaria a cardiopatía isquémica congénita también aumentan los niveles plasmáticos de TXA<sub>2</sub> y disminuyen los de PGI<sub>2</sub> (Barnes y Liu 1995).

### **I.V.3.2 Endotelinas (ETs)**

Las ETs son una familia de tres isopéptidos (ET-1, ET-2 y ET-3) de 21 aminoácidos, codificados por tres genes distintos (Inoue y cols., 1989). El gen que codifica la ET-1 se localiza en el cromosoma 7 y predomina a nivel de endotelio, músculo liso vascular, corazón, pulmón, riñón y páncreas. El gen que codifica la ET-2 predomina en el endotelio y en la musculatura lisa intestinal, corazón, estómago, placenta y útero. La expresión de la ET-3 predomina a nivel central, pulmonar, digestivo y renal, pero no tiene lugar a nivel endotelial (Haynes y Webb, 1993). El producto inicial del gen de ET-1 humano es el péptido preproET-1 (212 aminoácidos), que se convierte primero en proET-1 (183 aminoácidos) y, posteriormente, en un péptido de 38 residuos, la "big" ET-1 (Yanagisawa y cols., 1988). Ésta, a su vez, se convierte en ET-1 por la acción de las enzimas convertidoras de la endotelina (ECE) (Xu y cols., 1994; Oppenorth y cols., 1992). La síntesis y liberación de ET-1 es estimulada por A-II, NA, trombina, TGF $\beta$ , PDGF, ésteres de forbol, interleucina 1- $\beta$ , vasopresina, hipoxia, endotoxemia, glucosa y fuerzas de cizallamiento vascular (Levin, 1995; Webb, 1997; Ferro y Webb, 1996).

Los efectos de las ETs están mediados a través de receptores denominados ET<sub>A</sub> (ET-1 = ET-2 >> ET-3), ET<sub>B</sub> (ET-1 = ET-2 = ET-3) y quizás ET<sub>C</sub> (ET-3 > ET-1 = ET-2), que presentan una homología del 66% (Levin, 1995; Miller y cols., 1993; Rubanyi y Polokoff,

1994; Sakurai y cols., 1990). En general, las CMLV pulmonares presentan sólo receptores tipo  $ET_A$ , mientras que las células endoteliales sólo receptores  $ET_B$  (Hosoda y cols., 1991; Ogawa y cols., 1991); sin embargo en algunas CMLV, como las pulmonares de conejo, parecen coexistir ambos tipos de receptores (LaDouceur y cols., 1993).

Dependiendo del tono vascular previo, las ETs pueden producir vasoconstricción o vasodilatación pulmonar. En condiciones basales, los tres isopéptidos producen vasoconstricción pulmonar, siendo la ET-1 el más potente (Levin, 1995; Webb, 1997, Ferro y Webb, 1996). También aumenta el tono simpático central y periférico y estimula la liberación de ANP, renina, A-II, aldosterona y adrenalina (Kawaguchi y cols., 1990). Por otro lado, la ET-1 potencia los efectos de otros vasoconstrictores, como NA, 5-HT, vasopresina y A-II (Yang y cols., 1990). Cuando el tono vascular está elevado, algo que sucede durante la vida fetal (Perreault y De Marte, 1991; Wong y cols., 1994) o tras el uso de agentes vasoconstrictores, las ETs producen vasodilatación pulmonar (Crawley cols., 1992; Hasunuma y cols., 1990; Lippton y cols., 1991; Toga y cols., 1991; Wong y cols., 1993). La respuesta vasoconstrictora de las ETs es mediada por los receptores  $ET_A$ , y la relajación por los  $ET_B$  (Hay y cols., 1993; Sudjarwo y cols., 1993); sin embargo, se ha descrito que parte de la vasoconstricción inducida por las ETs a nivel pulmonar pudiera estar mediada por un subtipo del receptor  $ET_B$  (Perreault y Baribeau, 1995; Sumner y cols., 1992). La ET-1 también estimula la síntesis de ADN y la proliferación de fibroblastos y de CMLV pulmonares (Janakidevi y cols., 1992; Peacock y cols., 1992); este efecto mitogénico está mediado a través de la estimulación de receptores  $ET_A$ , ya que se bloquea por BQ-123 (Zamora y cols., 1993).

Ambos receptores,  $ET_A$  y  $ET_B$ , están acoplados a proteínas G (Levin, 1995; Rubanyi y Polokoff, 1994). La vía de señalización de la respuesta constrictora de las ETs implica la activación de la fosfolipasa C y la hidrólisis del  $PIP_2$  en  $IP_3$  y diacilglicerol (DAG) (Fig 3). El  $IP_3$  aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$ , tanto por facilitar su liberación desde los depósitos intracelulares como por aumentar su entrada a través de la membrana celular. El DAG activa la PKC, lo que aumenta la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  (Karakaki y Matsuda, 1996; Levin, 1995; Sudjarwo y cols., 1995). La ET-1 también bloquea los canales  $K_{ATP}$  (Miyoshi y cols., 1992), por lo que despolariza la membrana y facilita la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje y aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$ , produciendo vasoconstricción. La ET-1, además, activa la fosfolipasa  $A_2$ , aumentando la síntesis de productos de degradación del AA, que pueden contribuir a sus efectos vasoconstrictores (Toga y cols., 1991).

Por otro lado, la ET-1 reduce la presión arterial pulmonar en corderos recién nacidos con hipertensión pulmonar inducida por el U46619; este efecto vasodilatador de la ET-1 parece estar mediado a través de la liberación del NO endotelial, la activación de los canales de potasio y la estimulación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Crawley y cols., 1992; Hasunuma y cols., 1990; Lippton y cols., 1991; Perreault y De Marte, 1991; Wong y cols., 1993).

## **Papel de las ETs en la transición de la circulación fetal a la del adulto**

La ET-1 contribuye al mantenimiento del alto tono vascular pulmonar fetal, probablemente a través de la activación de los receptores ET<sub>A</sub> (Ivy y cols., 1994) y al descenso de las RVP que la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> produce tras el nacimiento (Wong y cols., 1994). De hecho, la densidad de receptores de ET-1 es extremadamente abundante en vasos pulmonares de lechones recién nacidos (Perreault y Baribeau, 1995) y se ha descrito que a los 2-3 días del nacimiento aumenta la fijación de la ET-1 al receptor ET<sub>B</sub> (Hislop y cols., 1995). La ET-1 es, además, un potente vasoconstrictor del *ductus arteriosus* (Coceani y cols., 1992) y podría intervenir en su cierre tras el nacimiento. Por otra parte, se ha descrito que la actividad de la ECE disminuye con la edad postnatal (Liben y cols., 1993), lo que reduciría la síntesis de la ET-1 y podría explicar, en parte, la reducción de las RVP tras el nacimiento.

## **Papel de las ETs en la HPPN**

La ET-1 ha sido implicada en el elevado tono vascular pulmonar propio del feto (Wang y Coceani y cols., 1992; Ivy y cols., 1994) y en el desarrollo de la vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia en el recién nacido (Wang y cols., 1995; Ivy y cols., 1996). De hecho, los niveles de ET-1 inmunorreactiva están elevados en recién nacidos con HPPN (Christou y cols., 1997; Kumar y cols., 1996; Rosenberg y cols., 1993), así como en pacientes con hipertensión pulmonar primaria (Giaid y cols., 1993), con síndrome de distress respiratorio (Druml y cols., 1993) y durante y tras la cirugía pulmonar (Onizuka y cols., 1991). Este aumento de los niveles de ET-1 se ha observado también en diversos modelos experimentales de hipertensión pulmonar, incluyendo la inducida por sepsis, hipoxia o monocrotalina (Miyachi y cols., 1993; Weitzberg y cols., 1996) y en la progresión de la hipertensión pulmonar causada por la insuficiencia cardíaca congestiva (Sakai y cols., 1996). La estimulación de la proliferación de fibroblastos y CMLV inducida por la ET-1 (Janakidevi y cols., 1992), podría, además, participar en el remodelado vascular pulmonar en estos modelos experimentales. De hecho, los antagonistas de receptores de ET-1 han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la hipertensión pulmonar primaria y de la inducida por monocrotalina o asociada a insuficiencia cardíaca (Miyachi y cols., 1993; Sakai y cols., 1996).

### **I.V.3.3 Oxido nítrico (NO)**

En 1980, Furchgott y Zawadzki, demostraron que el endotelio producía un factor que era responsable de la relajación del músculo liso vascular en respuesta a la ACh. Posteriormente, Palmer y cols. (1987) e Ignarro y cols. (1987a) lo identificaron con el óxido nítrico (NO).

El NO es uno de los principales mediadores endógenos y presenta propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas. Se sintetiza a partir de la L-arginina por la NO sintasa (NOS), de la que se conocen 3 isoformas: NOS<sub>e</sub>, que es constitutiva de las células endoteliales; NOS<sub>i</sub>, que es inducible y se presenta en macrófagos y células musculares lisas; y NOS<sub>n</sub>, isoforma neural constitutiva, presente en el tejido nervioso y en la médula renal. El

NO se libera de las células endoteliales en respuesta a fuerzas físicas (cizallamiento, presión) y humorales (ACh, bradicinina, catecolaminas, A-II, ET-1, vasopresina, trombina, ATP y AA, entre otros) y difunde libremente hacia las CMLV, donde estimula a la guanilato ciclasa soluble y aumenta los niveles intracelulares de GMPc, produciendo vasodilatación (Barnes y Liu, 1995; Rubanyi y cols., 1986). Este nucleótido cíclico es el principal mediador de la respuesta vasodilatadora del NO, aunque el NO puede producir vasodilatación a través de otros mecanismos independientes del GMPc (Plane y cols., 1998). Así, el NO produce hiperpolarización de las CMLV a través de la activación de diversos canales de potasio: activados por  $Ca^{2+}$  o  $K_{Ca}$  (Archer y cols., 1994; Bolotina y cols., 1994; Geoge y Shibata, 1995; Robertson y cols., 1993; Zhao y cols., 1997), que presentan recificación tardía o  $K_V$  (Yuan y cols., 1996; Zhao y cols., 1997) y  $K_{ATP}$  (Garland y McPherson, 1992; Murphy y Brayden, 1995). Los fármacos dadores de NO, como el nitroprusiato sódico (NPS) y la nitroglicerina, producen también activación de los canales  $K_{Ca}$  (Bychkov y cols., 1998; Khan y cols., 1998). Aparte de la activación de los canales de potasio, se han descrito numerosos mecanismos por los que el GMPc produce vasodilatación pulmonar: activación de la SERCA (Cohen y cols., 1999; Khan y cols., 1998; Rashatwar y cols., 1987) y de la PMCA (Barnes y Liu, 1995), activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Tamaoki y cols., 1997; Rapoport y cols., 1985), cierre de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (Ruiz-Velasco y cols., 1998) e inhibición de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS inducida por  $IP_3$  (Hirata y cols., 1990; Ji y cols., 1998). Además de todos estos mecanismos que reducen la  $[Ca^{2+}]_i$ , la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  también parece estar involucrada en relajación que sigue a la activación de la vía del GMPc (Karaki y cols., 1997; Kitazawa y cols., 1996; McDaniel y cols., 1992).

La importancia del NO en la regulación del tono vascular pulmonar es evidente teniendo en cuenta que numerosos mediadores vasoactivos producen vasodilatación pulmonar a través de su liberación. Tal es el caso de la ACh (McMahon y cols., 1991), la bradicinina (Ignarro y cols., 1987b), la NA (Liu y cols., 1991a), la histamina (Ortiz y cols., 1992), el ATP (Liu y cols., 1992a) y la ET-1 y ET-3 (Crawley y cols., 1992).

### **Papel del NO en la transición de la circulación fetal a la del adulto**

La actividad del NO endotelial pulmonar es ya patente durante la vida fetal en el cordero (Abman y cols., 1990; Shaul y cols., 1993; Davidson y Heldemerdash, 1990), pero no en el cerdo (Liu y cols., 1992b). Sin embargo, en ambas especies, la producción de NO y la vasodilatación endotelio-dependiente sufren un espectacular aumento tras el nacimiento y a medida que avanza la edad (Abman y cols., 1991; Zellers y Vanhoutte, 1991; Liu y cols., 1992b; Shaul y cols., 1993). La administración de L-NAME ( $N^G$  nitro-L-arginina metil éster), un inhibidor de la síntesis de NO, produce un marcado aumento del tono arterial pulmonar fetal (Abman y cols., 1990); si a continuación se practica una cesarea y se extraen los fetos, se observa como al suprimir la circulación placentaria aparece una elevación persistente de la presión arterial pulmonar, lo que confirma el papel del NO en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto (Fineman y cols., 1995). De hecho, se ha descrito que los principales procesos implicados en la vasodilatación pulmonar postnatal como el aumento de

la  $pO_2$ , el incremento del flujo sanguíneo y el estiramiento mecánico pulmonar estimulan la liberación de NO endotelial (Tiktinski y Morin, 1993; Cornfield y cols., 1992; Shaul y cols., 1992). Los posibles mecanismos implicados en el aumento de la actividad del NO endotelial tras el nacimiento incluyen: a) un aumento en la actividad de la NOSe debido a un incremento en su expresión o a una mayor disponibilidad de su sustrato (L-arginina) o cofactores, (Abman y cols., 1991; Shaul, 1993). b) Una mayor sensibilidad de las CMLV al NO (Zellers y Vanhoutte, 1991). c) Al aumentar la  $pO_2$  se liberan bradicinina y ATP, que a su vez incrementan la síntesis y liberación del NO de las células endoteliales pulmonares (Banerjee y cols., 1994; Konduri y Woodard, 1991). d) Una disminución del aclaramiento pulmonar del NO por la hemoglobina, ya que cuando ésta se satura de  $O_2$  presenta menor afinidad por el NO que en su forma deoxigenada (Iwamoto y Morin, 1993). e) Un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa, lo que disminuye la formación del radical superóxido y su acción inhibitoria sobre el NO (Morecroft y McLean, 1998).

### **Papel del NO en la HPPN**

En diversos modelos experimentales, el bloqueo de la síntesis de NO endotelial genera un cuadro similar al que se observa en la HPPN (Abman y cols., 1989; Fineman y cols., 1995; Morin y Stenmark, 1995). Además, en diversos tipos de hipertensión pulmonar se ha observado una reducción en la respuesta vasodilatadora inducida por la activación de la vía del NO/GMPc y en los niveles plasmáticos de nitritos (Stamler y cols., 1994), lo que conlleva un aumento de las respuestas inducidas por los mediadores vasoconstrictores (Dinh-Xuan y cols., 1991; Giaid y Saleh, 1995). La menor respuesta vasodilatadora de la vía NO/GMPc se ha atribuido a una reducción en la expresión de la NOSe (Rengasamy y Johns, 1991; Villamor y cols., 1997a), a una disminución de la guanilato ciclasa soluble (Steinhorn y cols., 1995) y a un aumento de la actividad de la fosfodiesterasa tipo V (Hanson y cols., 1996).

## I.VI. PAPEL DE LOS CANALES $K_{ATP}$ EN LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

### I.VI.1. Canales de potasio: papel sobre el potencial de membrana, estructura y tipos

El tono del músculo liso vascular es regulado, en gran medida, por cambios en el potencial de membrana (ver apartado I.II.2), de tal forma que, variaciones del mismo de tan sólo unos milivoltios modifican muy significativamente el diámetro vascular (Nelson y cols., 1990; Brayden y Nelson, 1992). La actividad de los canales de  $K^+$  modula el potencial de membrana y desempeña un papel decisivo en el control del tono vascular y en la regulación de las resistencias vasculares periféricas y de la presión arterial (Rush y Stekiel, 1991; Siegel y cols., 1992). La apertura de los canales de  $K^+$  aumenta el flujo de salida de  $K^+$  hacia el medio extracelular, a favor de su gradiente electroquímico, lo que produce hiperpolarización de la membrana celular (Cook, 1988), cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y vasodilatación; por el contrario, su cierre produce despolarización, apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y vasoconstricción.

Atendiendo a su estructura, los canales de  $K^+$  pueden clasificarse en dos grandes familias: los dependientes de cambios de voltaje y los que presentan rectificación interna. Dentro de la familia de los canales dependientes de voltaje se encuentran los que presentan rápida activación e inactivación ( $K_A$ ), los que presentan rectificación tardía ( $K_V$ ) y los dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), que a su vez se subdividen según presenten una conductancia alta ( $BK_{Ca}$ ), media ( $IK_{Ca}$ ) o baja ( $SK_{Ca}$ ). La segunda familia engloba los rectificadores internos propiamente dichos,  $K_{IR}$ , y los dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). La estructura básica de ambas familias está constituida por 4 subunidades  $\alpha$  y 4  $\beta$ . Los canales dependientes de cambios de voltaje poseen 6 dominios transmembrana en cada subunidad  $\alpha$  (S1-S6) (Quast y cols., 1995), mientras que los canales que presentan rectificación interna poseen 2 dominios (M1 y M2); en todos ellos está muy conservada la región H5, que constituye el poro del canal.

Los canales  $K_{ATP}$  presentan un especial interés a nivel del músculo liso vascular, tanto desde el punto de vista fisiopatológico como terapéutico. En primer lugar, los canales  $K_{ATP}$  participan en la regulación del flujo sanguíneo producido en respuesta a cambios del metabolismo celular (Standen y cols., 1989; Edwards y Weston, 1993, 1995) y, por ello, son importantes en la regulación del aporte tisular de  $O_2$ . Además, los canales  $K_{ATP}$  pueden jugar un papel importante en el mantenimiento del tono del músculo liso arterial (Edwards y Weston, 1993, 1995; Quayle y cols., 1997), particularmente en el territorio pulmonar (Clapp y Gurney, 1992). Por último, la activación de estos canales es responsable del potente efecto vasodilatador de un grupo de fármacos denominados agonistas de canales de potasio (ACP) que actualmente se utilizan como antihipertensivos y antianginosos.

### I.VI.2. Canales $K_{ATP}$

La existencia de los canales  $K_{ATP}$  fue descrita, en primer lugar, en músculo cardíaco (Noma, 1983), y posteriormente, en páncreas (Ashcroft y cols., 1984; Cook y Hales, 1984), músculo esquelético (Spruce y cols., 1985), cerebro (Ashford y cols., 1988) y músculo liso (Standen y cols., 1989; Clapp y Gurney, 1992; Silberberg y van Breemen, 1992; Dart y Standen, 1993). Estos canales se inhiben por concentraciones intracelulares fisiológicas de ATP ( $[ATP]_i$  en el orden  $\mu M$ ) y se activan en condiciones de inhibición metabólica (hipoxia o isquemia) que implican una marcada disminución de la  $[ATP]_i$  y un aumento de los nucleótidos difosfato (Beech y cols., 1993; Edwards y Weston, 1995). De hecho, el cociente  $[ATP]_i / [\text{nucleótidos difosfato}]$  parece ser el principal determinante de la activación de la corriente de salida de  $K^+$  a través de este canal ( $I_{K_{ATP}}$ ) (Quast y cols., 1995).

Estructuralmente, estos canales son heteromultímeros de subunidades del receptor de las sulfonilureas (SUR) (Inagaki y cols., 1995) y de una proteína perteneciente a la superfamilia de los canales  $K_{IR}$  ( $K_{IR6.x}$ ) (Ashford y cols., 1994), asociados con una estequiometría 1:1, para formar un tetrámero,  $(SUR/K_{IR6.x})_4$  (Aguilar-Bryan y cols., 1998). Las subunidades  $K_{IR6.x}$  ( $K_{IR6.1}$  o  $K_{IR6.2}$ ) forman el poro del canal, mientras que las subunidades SUR (1, 2A o 2B) regulan su actividad (Aguilar-Bryan y cols., 1998). Los canales  $K_{ATP}$  del músculo liso vascular están formados por subunidades del tipo SUR2B y  $K_{IR6.1/6.2}$ .

Los agentes vasodilatadores, a través del incremento de los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPc) y los vasoconstrictores, a través de la activación de la PKC, pueden regular la actividad de los canales  $K_{ATP}$  (Bonev y Nelson, 1996). Así, diversos mediadores endógenos como CGRP (Kitazono y cols., 1993; Zhang y cols., 1994),  $PGI_2$  (Gollasch y cols., 1991; Jackson, 1993) y adenosina (Marshall y cols., 1993; Loutzenhiser y Parker, 1994) activan los canales  $K_{ATP}$  a través de la activación de la PKA y PKG. También se ha descrito que la activación de los canales  $K_{ATP}$  puede estar involucrada en el efecto vasodilatador de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Narishige y cols., 1994; Randall y McCulloch, 1995), VIP (Standen y cols., 1989; Nelson y cols., 1990), EDHF (Brayden, 1990; Plane y Garland, 1993), NO (Garland y McPherson, 1992; Murphy y Brayden, 1995), acidosis (Faraci y Heistad, 1993) e hipoxia, tanto a nivel cardíaco (Nakhostine y Lamontagne, 1993), cerebral (Taguchi y cols., 1994) y pulmonar (Wiener y cols., 1991). Entre los agentes vasoconstrictores que inhiben los canales  $K_{ATP}$  se incluyen: NA (Bonev y Nelson, 1996), histamina (Bonev y Nelson, 1996), 5-HT (Kleppisch y Nelson, 1995; Bonev y Nelson, 1996), ET-1 (Miyoshi y cols., 1992), neuropéptido Y (Bonev y Nelson, 1996), vasopresina (Wakatsuki y cols., 1992) y A-II (Miyoshi y Nakaya, 1991).

### I.VI.3. Agonistas e inhibidores de canales de $K_{ATP}$

Los agonistas de los canales  $K_{ATP}$  (ACP) son un grupo de fármacos de estructura heterogénea (Edwards y Weston, 1990, 1993; Quayle y cols., 1997), entre los que se encuentran: nicorandil, cromakalim, pinacidil, diazóxido, levromakalim, minoxidil, apricalim, bimakalim

y celikalim. Aunque algunos estudios han implicado la activación de los canales  $K_{Ca}$  en el efecto vasodilatador de los ACP (Gelband y cols., 1989; Okabe y cols., 1990; Kajioka y cols., 1991); sin embargo, la inhibición de estos canales por bloqueantes selectivos no parece afectar ni la hiperpolarización (Nelson y cols., 1990) ni a la vasodilatación (Meisheri y cols., 1993; Standen y cols., 1989) inducida por estos fármacos. Por tanto, la activación de los canales  $K_{Ca}$  jugaría un papel poco importante en la vasodilatación inducida por los ACP.

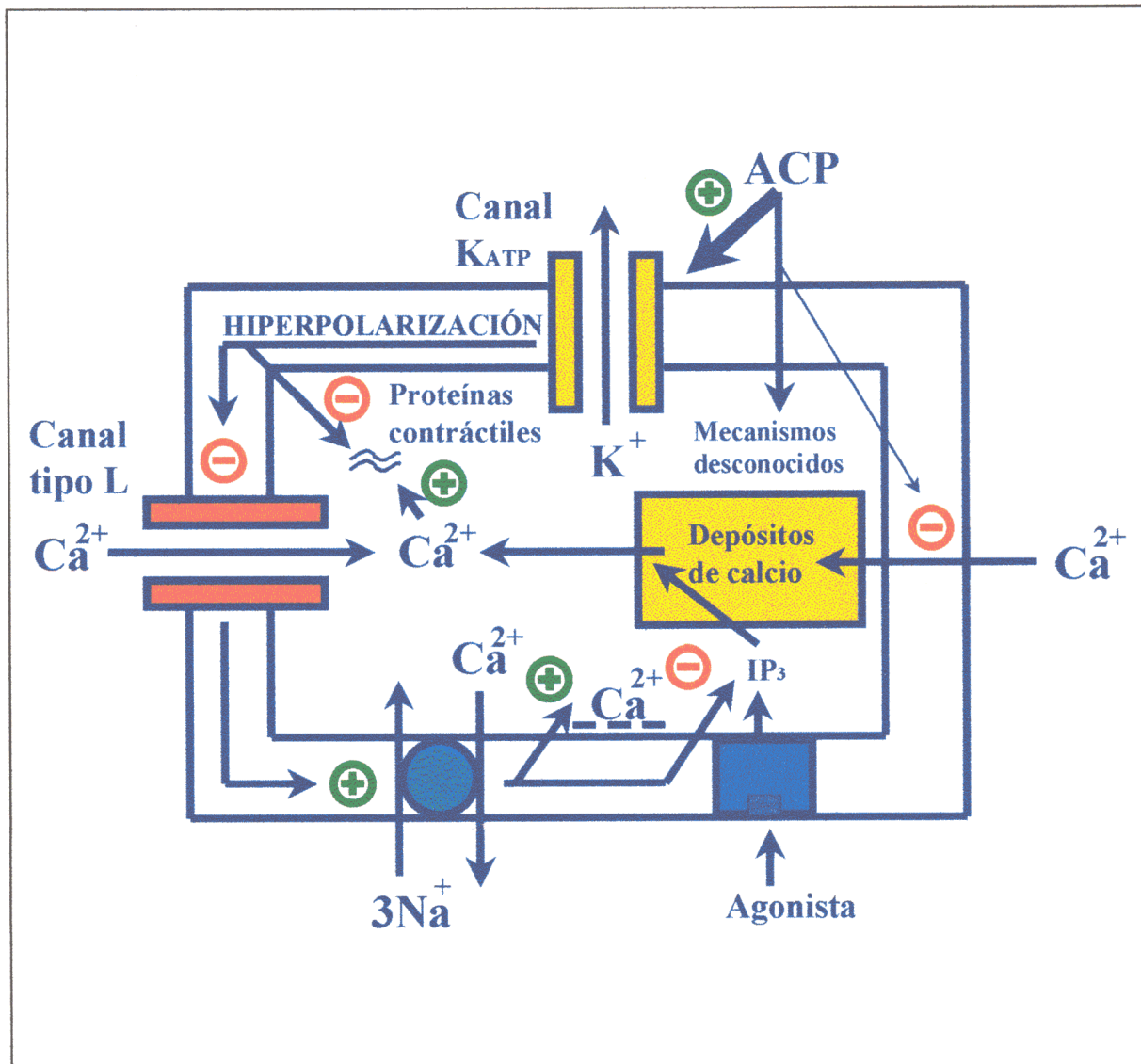
El mecanismo por el cual los ACP activan los canales  $K_{ATP}$  es todavía materia de debate (Quast y cols., 1995). Mientras que en muchos estudios, los ACP disminuyen la sensibilidad de los canales  $K_{ATP}$  por el ATP (Takano y Noma, 1990; Thuringer y Escande, 1989), en otros, la presencia de nucleótidos difosfato y  $Mg^{2+}$  aumenta la actividad de estos agentes (Shen y col., 1991); la fosforilación y la sulfatación de las proteínas del canal también han sido implicadas en el mecanismo de acción de los ACP (Quayle y cols., 1997).

Los ACP presentan una alta afinidad por el territorio vascular; de hecho, en estudios *in vivo* producen una reducción brusca de la presión sanguínea que va acompañada de taquicardia refleja y retención hidrosalina (Quast, 1992). Su efecto vasodilatador parece ser debido, principalmente, al cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L inducido por la hiperpolarización de la CMLV, por lo que podrían comportarse indirectamente como bloqueantes de los canales de  $Ca^{2+}$  (Quast y Cook, 1989). Sin embargo, la hiperpolarización de la membrana que resulta de la acción de los ACP también puede relajar la CMLV por otros mecanismos (Fig 4) como:

1. La inhibición de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde sus depósitos intracelulares por interferir en la síntesis del  $IP_3$  (Ito y cols., 1991; Yamagishi y cols., 1992).
2. El incremento de la salida de  $Ca^{2+}$  a través de la estimulación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Quast, 1993).
3. La reducción de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  (Okada y cols., 1993; Quast, 1993).
4. El aumento de la fijación de  $Ca^{2+}$  a la superficie interna de la membrana plasmática (Quast, 1993).

Además, los ACP pueden disminuir el relleno de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares por mecanismos independientes de su efecto hiperpolarizante (Quast, 1993) (Fig 4).

Los canales  $K_{ATP}$  son bloqueados de forma específica por diversas sulfonilureas, como la glibenclamida y la tolbutamida (Edwards y Weston, 1990, 1993; Quayle y cols., 1997). Además de las sulfonilureas, existen otros agentes capaces de bloquear los canales  $K_{ATP}$  de forma menos selectiva, tales como: 4-aminopiridina (4-AP) (a concentraciones mM) (Kakei y cols., 1985; Haworth y cols., 1989), tetraetilamonio (TEA) intracelular (Kakei y cols., 1985),  $Ba^{2+}$  extracelular (50-100  $\mu M$ ) (Kakei y Noma 1984), ciclazindol (Noack y cols., 1992), antagonistas de la calmodulina (Sakuta y cols., 1992b) y agentes antiarrítmicos (Haworth y cols., 1989, Sakuta y cols., 1992a; Cogolludo y cols., 1998).



**Figura 4.** Esquema de los posibles mecanismos de acción de los agonistas de canales de K<sup>+</sup> (ACP).

#### I.VI.4. Papel de canales de potasio en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto

La adaptación pulmonar al medio extrauterino se caracteriza no sólo por una brusca reducción de las RVP y un rápido remodelado estructural, sino también por cambios en el potencial de membrana, que está determinado, en gran medida, por la actividad de los canales de K<sup>+</sup>. Diversos estudios han demostrado que los canales de K<sup>+</sup> pueden participar en la relajación vascular pulmonar tras el nacimiento (Chang y cols., 1992; Pinheiro y Mailk, 1992).

De hecho los canales de  $K^+$  están presentes a lo largo del árbol vascular pulmonar incluyendo las arterias de resistencia (Boels, y cols., 1994; Albarwani y cols., 1995), se desarrollan tempranamente en la gestación (Chang y cols., 1992; Cornfield y cols., 1996) y se activan por oxígeno (Cornfield y cols., 1996) y fuerzas de cizallamiento (Cooke y cols., 1991). Evans y cols. (1998) han demostrado que las CMLV de arterias pulmonares de cerdo están despolarizadas en el momento del nacimiento pero se hiperpolarizan hasta alcanzar los niveles del adulto al cabo de unos 3 días. Esta hiperpolarización parece ser consecuencia de la apertura de canales de  $K^+$ , fundamentalmente, de los canales  $K_V$  y  $BK_{Ca}$  (Evans y cols., 1998). La corriente de salida de  $K^+$  través de los canales  $K_{ATP}$  representa un importante componente de la corriente total de  $K^+$  registrada tras el nacimiento (Evans y cols. 1998). De hecho, la activación de los canales  $K_{ATP}$  inducida por el levromakalim produce un marcado efecto vasodilatador de las arterias pulmonares, de conductancia y de resistencia, de cerdos con hipertensión pulmonar neonatal (Boels y cols., 1997; Pinheiro y Malik, 1992). La activación de los canales  $K_{ATP}$  puede, por tanto, representar un importante mecanismo de vasodilatación pulmonar en el recién nacido.

#### **I.VI.5. Papel de canales de potasio en la HPPN**

La hipoxia crónica es uno de los principales factores que intervienen en el desarrollo de la HPPN (Fineman y cols., 1995; Morin y Stenmark, 1995). Como se detalla en el apartado I.V.1 la hipoxia produce inicialmente una respuesta vasoconstrictora (VPH) que puede ser debida al bloqueo de los canales de  $K^+$ . De hecho, la exposición crónica a la hipoxia inhibe la expresión de la subunidad  $\alpha$  de los canales  $K_V$  (Wang y cols., 1997) y reduce marcadamente la corriente a su través (Smirnov y cols., 1994). En pacientes con hipertensión pulmonar primaria también se ha observado una reducción en la expresión de los canales  $K_V$  (Yuan y cols., 1998). Estos resultados confirman la participación de los canales de potasio en la hipertensión pulmonar causada por hipoxia crónica.

## I.VII. PAPEL DE LA ATPASA $\text{Na}^+/\text{K}^+$ EN LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

### I.VII.1 Características e importancia fisiológica de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o bomba de sodio, permite mantener los gradientes electroquímicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a ambos lados de la membrana celular (Skou, 1957). Esta enzima bombea 3 iones  $\text{Na}^+$  hacia el exterior de la célula y 2 iones  $\text{K}^+$  hacia el interior, lo que conlleva una reducción de cargas positivas a nivel intracelular, por ello, la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es electrogénica. La bomba de sodio se activa cuando aumenta la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular ( $[\text{Na}^+]_i$ ) y/o la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular ( $[\text{K}^+]_o$ ) y utiliza la energía del complejo MgATP.

La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  consta de dos subunidades catalíticas  $\alpha$  ( $\approx 120$  KDa), de la que existen tres isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) y dos subunidades  $\beta$  ( $\approx 55$  KDa), de la que existen tres isoformas ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ); la subunidad  $\alpha$  posee al menos 6 (o posiblemente 8) dominios transmembrana (Horisberger y cols., 1991; Kawakami y cols., 1986). El canal iónico está situado en la subunidad  $\alpha$ , que también contiene los sitios de unión para el  $\text{K}^+$  externo, el  $\text{Na}^+$  interno, los digitálicos y la hidrólisis del ATP.

La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  está involucrada en la regulación del volumen y de la concentración intracelular de otros iones, la contractilidad, el crecimiento y la diferenciación celular. En el músculo liso vascular, la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  juega un importante papel en la regulación del tono (Flemming, 1980; Hermsmeyer, 1982; O'Donnell y Owen, 1994). La activación de esta enzima induce una hiperpolarización de la membrana y la consiguiente vasodilatación por cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Por el contrario, su inactivación aumenta la  $[\text{Na}^+]_i$ , lo que produce, por un lado, la despolarización de la membrana y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo L y, por otro, la inversión del sentido del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , facilitándose la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. Así pues, el aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$ , que sigue a la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , facilitarían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , su recaptación por el RS y su posterior liberación al citosol (Borin y cols., 1994; Moore y cols., 1993).

La salida de  $\text{K}^+$  de un tejido es un índice de su estado metabólico y está implicada en la regulación local del flujo sanguíneo (Kuschinsky y cols., 1972). Pequeños aumentos de la  $[\text{K}^+]_o$  producen relajación del músculo liso vascular que es atribuida, en gran medida, a la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Bukoski y cols., 1983). Recientemente, Edwards y cols. (1998) han identificado la salida de  $\text{K}^+$  del endotelio a través de los canales  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  y  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  con el EDHF; esta salida de  $\text{K}^+$  activaría la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  produciendo hiperpolarización y vasodilatación de la CMLV. Ponte y cols. (1996) y Redondo y cols. (1995 y 1996) habían descrito previamente que las células endoteliales liberan un factor difusible que estimula la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la CMLV a través de la activación de la PKC. Todos estos hallazgos muestran la gran importancia fisiológica de esta enzima en la regulación de la presión y del flujo sanguíneo. Por otro lado, la incubación en una solución nutricia carente de  $[\text{K}^+]_o$  produce

la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , despolarización de la membrana y contracción de la CMLV (Hendrickx y Casteels, 1974); la reposición de  $\text{K}^+$  produce una respuesta vasodilatadora que ha sido considerada como evidencia indirecta de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Hendrickx y Casteels, 1974; Ponte y cols., 1996; Webb y Bohr, 1978).

### I.VII.2 Regulación de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$

La actividad de la ATPasa se estimula cuando aumenta la  $[\text{Na}^+]_i$  o disminuye la  $[\text{K}^+]_o$ . Así, la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  puede estimular su actividad. Además, la actividad ATPasa puede ser regulada por numerosos neurotransmisores, hormonas y factores locales (Ewart y Klip, 1995). Se ha descrito que la activación de la bomba contribuye, en parte, al efecto relajante de nitrovasodilatadores y agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos a través de la activación de la PKG (Rapoport y cols., 1985; Tamaoki y cols., 1997; Webb y Bohr, 1981). Sin embargo, la ATPasa también es estimulada por diversos agentes vasoconstrictores que activan la PKC; este es el caso de la ET-1 (Gupta y cols., 1991), la A-II (Brock y cols., 1982a), los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Navran y cols., 1988) y la 5-HT (Navran y cols., 1991). Estos agonistas también pueden estimular la ATPasa a través del aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  vía activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Curiosamente, la PKC también puede no modificar, o incluso disminuir la actividad de la ATPasa (Bertorello y cols., 1991; Ewart y Klip, 1995; Feschenko y Sweadner, 1994; Lynch y cols., 1986). Xia y cols (1995) han descrito que la activación de la PKC estimula directamente la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , aunque de forma indirecta, la inhibe, pues estimula la fosfolipasa  $\text{A}_2$  y aumenta los niveles de AA y sus metabolitos, que presentan una acción inhibitoria sobre la enzima (Schwartzman y cols., 1985; Satoh y cols., 1993). El mecanismo por el que PKG y PKC regulan la actividad de la ATPasa parece implicar la fosforilación de una serina de la subunidad  $\alpha$  (Beguin y cols., 1994; Feschenko y Sweadner, 1995).

### I.VII.3 Papel de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$ en VPH e hipertensión pulmonar

En situaciones de hipoxia disminuye la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en diversos tejidos incluyendo el territorio pulmonar (Bergofski y Holtzman, 1967; Haas y cols., 1975). Este efecto inhibitorio se ha relacionado con la menor vasodilatación pulmonar a nitrovasodilatadores observada durante la hipoxia (Tamaoki y cols., 1996). Por lo tanto, la inhibición de ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  podría estar implicada en la patogénesis de la VPH.

Diversos estudios han mostrado que la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  puede estar alterada en modelos animales y en pacientes con hipertensión arterial y/o diabetes (Brock y cols., 1982b; Blaustein y cols., 1986; Magliola y cols., 1986; Greene y cols., 1987). Por un lado, se ha descrito un aumento de la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en ratas espontáneamente hipertensas (Magliola y cols., 1986; Brock y cols., 1982b), tras el tratamiento con A-II (Brock y cols., 1982a) y tras el estiramiento vascular (Liu y cols., 1998), posiblemente para compensar el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  observado en estos modelos de hipertensión (Friedman

y cols., 1975). Otros autores han sugerido que la inhibición de esta enzima puede jugar un importante papel fisiopatológico en la formación de hipertensión esencial (Blaustein, 1996; O'Donnell y Owen, 1994; de Wardener, 1996). En este sentido, cabe reseñar los estudios realizados en los últimos años acerca de la existencia de inhibidores endógenos de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (factores endógenos tipo-ouabaína), posiblemente de origen hipotalámico (Hauptert y cols., 1984). Estos factores producen un aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  y del tono vascular (Magargal y Overbeck, 1986), presentan propiedades proliferativas (Montero y cols., 1993) y pueden contribuir a la generación de diversas formas de hipertensión arterial (Chen y cols., 1993; Ferrandi y cols., 1993). Además, se han aislado niveles elevados de estos factores en niños recién nacidos (Ghione y cols., 1993). Desgraciadamente existen pocos estudios sobre el papel de la ATPasa de la CMLV en el desarrollo de hipertensión pulmonar.

### I.VIII.6. Tratamiento de la HPPN

La morbi-mortalidad asociada a la HPPN está íntimamente relacionada con la gravedad y duración de la hipoxemia sistémica. Los tratamientos actuales (ventilación asistida, ventilación de alta frecuencia y, vasodilatadores como la hidralazina, la tolazolina o la PGD<sub>2</sub>) se muestran en muchos casos inefectivos y, terapias más invasivas, como la oxigenación con membrana extracorpórea causan gran morbilidad y algunas veces la muerte.

Por ello, es imprescindible la búsqueda de agentes vasodilatadores de acción rápida, fácil administración y alta selectividad por el territorio pulmonar. En este sentido, en los últimos años se ha introducido en terapéutica el NO inhalado (NO<sub>i</sub>) para el tratamiento de la HPPN. El tratamiento con NO revierte la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, U46619 o heparina-protamina (Barnes y Liu, 1995). La inhalación de NO dilata selectivamente la circulación pulmonar en la oveja, pues su rápida fijación a la hemoglobina evita que ejerza sus acciones a nivel de la circulación sistémica (Frostell y cols., 1991; Rimar y Gillis, 1992). En niños con HPPN, la inhalación de NO reduce las RVP y aumenta la pO<sub>2</sub> y el flujo sanguíneo pulmonar (Kinsella y cols., 1993; Roberts y cols., 1992). Estos efectos se potencian si se asocia un bloqueante de la fosfodiesterasa que degrada el GMPc (Braner y cols., 1993). Sin embargo, si bien en muchos pacientes se han observado resultados muy beneficiosos tras el tratamiento con NO<sub>i</sub> (Kinsella y Abman, 1995; Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group, 1997), en otros no se constata este beneficio (Goldman y cols., 1996; Inhaled Nitric Oxide Study Group, 1997; Muller y cols., 1996).

La PGI<sub>2</sub>, que se ha utilizado como terapéutica coadyuvante en la HPPN (Lock y cols., 1979), es capaz de revertir el cortocircuito de derecha a izquierda (Eronen y cols., 1997) y el *epoprostenol*, un análogo estable de la PGI<sub>2</sub>, mejora la hemodinámica y aumenta la supervivencia en pacientes con hipertensión pulmonar primaria que no responden al tratamiento con otros vasodilatadores orales (Barst y cols., 1996; Gaine y Rubin, 1998; Higenbottam y cols., 1984). En el momento actual se está evaluando la eficacia terapéutica del iloprost (otro análogo de la PGI<sub>2</sub>) administrado por vía inhalatoria en un estudio prospectivo europeo y se están desarrollando otras vías de administración como la transdérmica (Gaine y Rubin, 1998). La asociación de NO<sub>i</sub> con la PGI<sub>2</sub> podría representar una estrategia terapéutica más efectiva (Parker y cols., 1997). Uno de los principales mecanismos responsable de la vasodilatación inducida por la PGI<sub>2</sub> es el aumento del AMPc y la posterior activación de los canales K<sub>ATP</sub>. Como se ha descrito en el apartado I.VI.4, los canales K<sub>ATP</sub> pueden intervenir en la adaptación pulmonar perinatal normal y su activación produce una marcada vasodilatación de las arterias pulmonares en cerdos recién nacidos con hipertensión pulmonar (Barnes y Liu, 1995; Boels y cols., 1997; Pinheiro y Malik, 1992). Además, los ACP pueden presentar una mayor selectividad por el territorio pulmonar que por el sistémico en situaciones hipertensión pulmonar (Wanstall, 1996) y una mayor efectividad que los antagonistas del calcio para revertir la hipertensión pulmonar crónica (Oka y cols., 1993). Por todo ello, la activación de los canales K<sub>ATP</sub> puede representar una diana terapéutica en la HPPN y la administración de ACP podría ser de utilidad en su tratamiento.

## ***II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS***

Tras el nacimiento debe producirse una brusca transición de la placenta al pulmón como órgano encargado del intercambio gaseoso. Esta transición requiere una drástica reducción de las RVP, que de no producirse puede conducir al desarrollo de la HPPN. Este síndrome puede ser consecuencia de un desequilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, predominando la acción de estos últimos. En este sentido, la HPPN se ha relacionado con una disminución de la actividad vasodilatadora de la vía del NO/GMPc y/o con un aumento de la actividad vasoconstrictora del TXA<sub>2</sub> y/o de la ET-1. En estudios realizados por nuestro grupo de investigación se ha observado que la activación de los receptores del TXA<sub>2</sub> inducida por el U46619 inhibe la vasodilatación mediada por la vía del NO/GMPc a través de un mecanismo sensible a estaurosporina, un inhibidor de la PKC (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). Sin embargo, aún desconocemos a que nivel de la vía del NO/GMPc se produce esta interacción.

En esta Tesis Doctoral se pretende ampliar este estudio y analizar, además, dos de los principales mecanismos fisiológicos de hiperpolarización y vasodilatación pulmonar, como son la activación de los canales K<sub>ATP</sub> y de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. El estudio de estos dos mecanismos tiene un indudable interés si tenemos en cuenta que su activación puede estar implicada en las acciones de los principales agentes vasodilatadores liberados por el endotelio (NO, prostaciclina y EDHF).

Las canales K<sub>ATP</sub> están presentes a lo largo del árbol vascular pulmonar y su activación está involucrada en la vasodilatación inducida por cambios metabólicos (hipoxia, isquemia). Estos canales pueden ser activados por un grupo de fármacos denominados agonistas de canales de potasio (ACP), entre los que se encuentra el levcromakalim, que podrían constituir una estrategia terapéutica que permitiera aumentar la vasodilatación pulmonar inducida a través de la vía del NO/GMPc. Por ello, es importante estudiar la asociación de las vías de relajación del NO/GMPc y de los canales K<sub>ATP</sub>.

La activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> es responsable de la vasodilatación inducida por pequeños aumentos de la [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> y está implicada en el efecto vasodilatador de los agonistas β-adrenérgicos y de los nitrovasodilatadores; además, su actividad puede modificarse por la acción de distintos agentes vasoconstrictores.

Por todo ello, los **objetivos** que nos hemos propuesto en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Estudiar la vasodilatación inducida por la activación de la vía del NO/GMPc, de los canales K<sub>ATP</sub> y de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en arterias pulmonares y mesentéricas de lechones recién nacidos, así como los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducidos por estas vías de vasodilatación.
2. Evaluar el/los mecanismo/s implicado/s en la vasodilatación inducida por la vía del NO/GMPc en arterias pulmonares y mesentéricas de lechones recién nacidos y en la interacción entre el U46619 y esta vía de vasodilatación en las arterias pulmonares.

3. Analizar la relajación inducida tras la activación conjunta de las vías del NO/GMPc y de los canales  $K_{ATP}$  en arterias pulmonares de lechones recién nacidos. Para ello se estudiarán los efectos vasodilatadores del nicorandil, un agente que comparte ambos mecanismos de acción, y los de la combinación de NPS y levromakalim, lo que permitirá, a su vez, determinar las posibles interacciones entre ambas vías de vasodilatación.

4. Estudiar las respuestas vasoconstrictoras y los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la NA, el U46619 y la ET-1 en arterias pulmonares y mesentéricas de lechones recién nacidos, así como su interacción con las vías de vasodilatación: del NO/GMPc, de los canales  $K_{ATP}$  y de la ATPasa  $Na^+/K^+$ .

## ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***

### **III.I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado las arterias pulmonares y mesentéricas de lechones de raza híbrida Landrace-Largewhite de unas 2-3 semanas de vida y de entre 3-5 Kg de peso. La elección de esta especie animal se ha basado en que el cerdo y el humano recién nacidos presentan analogías estructurales en la adaptación de su circulación pulmonar fetal a la adulta y en los procesos fisiopatológicos y terapéuticos de la HPPN (Haworth y Hislop, 1981; Sánchez-Luna y cols., 1993). Con el objetivo de comprobar si los hallazgos obtenidos a nivel pulmonar eran específicos de este territorio vascular, hemos comparado los resultados con aquéllos obtenidos en arterias mesentéricas del mismo animal.

### **III.II. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS**

Los pulmones y lechos mesentéricos se obtuvieron del matadero de Navalcarnero. Tras el sacrificio de los animales, las preparaciones se sumergían de forma inmediata en solución Krebs normal (Tabla 2). Posteriormente, se transportaban al laboratorio en una nevera portátil que permitía mantener la temperatura de la solución nutritiva a 4° C. Una vez en el laboratorio se disecaban las arterias pulmonares de la tercera rama y la mesentérica principal, que presentaban un diámetro interno similar (1-2 mm). Posteriormente, se eliminaba cuidadosamente el tejido graso y la adventicia y las arterias se cortaban en anillos de unos 3-4 mm de longitud.

### **III.III. TÉCNICAS EMPLEADAS**

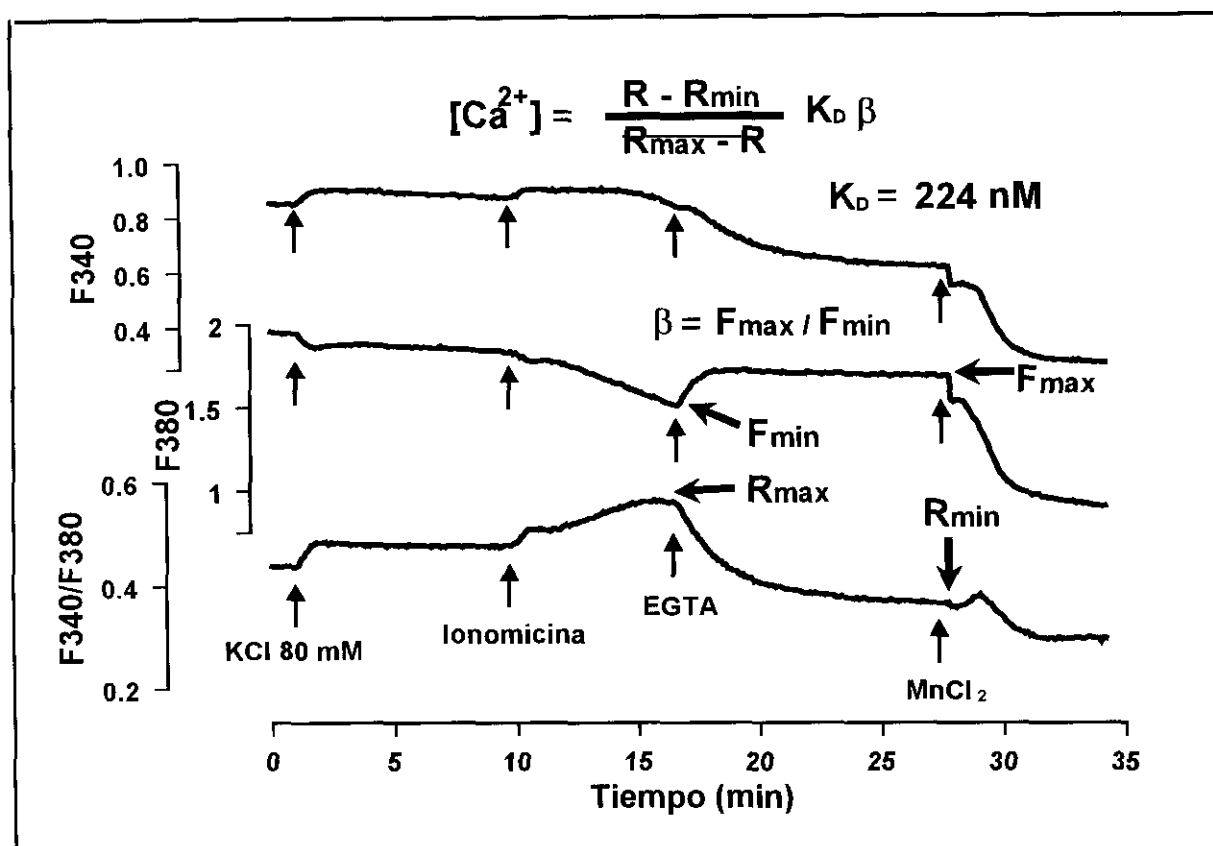
#### **III.III.1. Registro de contractilidad en arterias pulmonares y mesentéricas aisladas.**

Las preparaciones se montaban en copas de Allhin de 5 mL termostalizadas (37°C) que contenían solución Krebs normal burbujeada con mezcla carbógena (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Los anillos arteriales se montaban entre dos alambres de acero con forma de L (0.2 mm de diámetro), uno se fijaba a la copa y el otro a un transductor de fuerza acoplado a un amplificador de señal (Modelo PRE 206-4, Cibertec, Madrid) y a un ordenador Hewlett Packard (Pérez-Vicaino y cols., 1997). La fuerza contráctil se registraba mediante el programa de ordenador REGXPC (Cibertec, Madrid). A los anillos se les aplicaba una tensión (0.5 y 2 g para arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente) que permitía alcanzar una respuesta contráctil óptima, según habíamos observado en experimentos previos. Las preparaciones se dejaban estabilizar durante 60-90 minutos, lavándose cada 30 minutos con solución Krebs normal (Pérez-Vizcaino y cols., 1997).

### III.III.2. Registro simultáneo de contractilidad y $[Ca^{2+}]_i$ por fluorimetría.

En estos experimentos, los anillos arteriales eran invertidos para mejorar la señal fluorescente, de forma que la cara luminal de la arteria quedaba expuesta al exterior. Posteriormente, eran incubados durante 4-6 horas en una solución Krebs normal que contenía el reactivo fluorescente, fura-2 acetoximetilester ( $5 \times 10^{-6}M$ ) y cremofor EL (0.05%), un detergente que permitía la disolución del fura-2. Una vez transcurrido ese tiempo, las preparaciones eran montadas en una cámara que formaba parte de un fluorímetro (CAF-110 Jasco, Japón) especialmente diseñado para el registro simultáneo de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la fuerza contráctil (Salomone y cols., 1995; Pérez-Vizcaíno y cols., 1998). La cara interna de cada anillo era iluminada de forma alternativa (128 Hz) a 340 y 380 nm con una lámpara de xenon acoplada a dos monocromadores. La luz fluorescente emitida a esas dos longitudes de onda de excitación (F340 y F380) fue medida por un fotomultiplicador provisto de un filtro de 500 nm y registrada al mismo tiempo que los datos de fuerza contráctil mediante un sistema de adquisición de datos (Mac Lab serie E) y un programa de archivo de datos (Chart v3.2, AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). El cociente de la fluorescencia emitida tras la excitación a ambas longitudes de onda (F340/F380) fue utilizado como indicador de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Sato y cols., 1988; Pérez-Vizcaíno y cols., 1998).

**Calibración de la señal de  $[Ca^{2+}]_i$ .** La Fig 5 muestra un registro original de la calibración de la señal de  $Ca^{2+}$  en una arteria pulmonar. En primer lugar, los anillos eran expuestos a 80 mM de KCl, que producía aumento de la F340, disminución de la F380 e incremento del cociente F340/F380 y de la fuerza contráctil. A continuación, eran tratados primero con ionomicina ( $1.4 \times 10^{-5}M$ ) y después con ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA, 8 mM), lo que nos permitió obtener las señales fluorescentes de  $Ca^{2+}$  máxima y mínima, respectivamente. Posteriormente, se añadía  $MnCl_2$  (10 mM), que se unía al fura-2 desplazando todo el  $Ca^{2+}$ , con lo que se eliminaba toda la fluorescencia debida al complejo fura-2- $Ca^{2+}$  y quedaba la fluorescencia propia del tejido o autofluorescencia. Según la ecuación de Grynkiewicz (Fig 5) y asumiendo un valor de la  $K_D$  para el fura-2 de 224 nM (Grynkiewicz y cols., 1985), el valor estimado de la  $[Ca^{2+}]_i$  en arterias pulmonares y mesentéricas fue, respectivamente de  $105 \pm 19$  nM y  $124 \pm 13$  nM en condiciones basales y de  $196 \pm 63$  nM ( $n = 4$ ) y  $224 \pm 24$  nM ( $n = 4$ ) tras la estimulación con 80 mM de KCl.



**Figura 5.** Registro original de la calibración de la señal de  $[Ca^{2+}]_i$  en una arteria pulmonar. Se muestran los cambios simultáneos de la señal fluorescente emitida a las longitudes de onda de excitación de 340 nm (F340) y 380 nm (F380) y su cociente (F340/F380). La  $[Ca^{2+}]_i$  se determina mediante la ecuación de Grynkiewicz (parte superior) donde: R es la señal fluorescente del cociente F340/F380;  $R_{max}$  y  $R_{min}$  son la señal fluorescente máxima y la mínima del cociente F340/F380 obtenida tras el tratamiento con ionomicina y EGTA, respectivamente;  $\beta$  es el cociente  $F_{max} / F_{min}$ , siendo  $F_{min}$  y  $F_{max}$  la señal fluorescente F380 mínima y máxima obtenida tras el tratamiento con ionomicina y EGTA, respectivamente. Se asumió una constante de disociación del complejo  $Ca^{2+}$ -fura-2 ( $K_D$ ) de 224nM (Grynkiewicz y cols., 1985).

### III.IV. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

#### III.IV.1. Ausencia de endotelio.

En todos los experimentos el endotelio fue eliminado haciendo pasar por la luz del vaso un alambre de acero (0.8 mm) y, posteriormente, frotando suavemente con un movimiento de rotación. La ausencia de endotelio se comprobó evaluando la incapacidad de la ACh ( $10^{-7}M$ ) para relajar anillos precontraídos con NA ( $10^{-6}M$ ).

### **III.IV.2. Vasodilatación inducida por NPS y S-Nitroso N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619.**

Tras un período de estabilización de 1-2 horas, los anillos se contraían con concentraciones del agente vasoconstrictor que permitían obtener una respuesta contráctil de similar amplitud. A menos que se indique lo contrario, las concentraciones utilizadas fueron  $10^{-5}$ M para la NA y  $10^{-7}$ M para el U46619 en arterias pulmonares y  $10^{-6}$ M para ambos agonistas en arterias mesentéricas. Estas concentraciones producían contracciones submáximas similares, que representaban el 60-90% de la máxima respuesta vasoconstrictora inducida por NA y U46619 en las arterias pulmonares y mesentéricas. Una vez que la respuesta vasoconstrictora inducida por ambos agonistas alcanzaba valores estables, las arterias se relajaban con dosis crecientes y acumulativas de dos dadores de NO, como son el NPS ( $10^{-8}$  -  $3 \times 10^{-5}$ M) y el SNAP ( $10^{-8}$  -  $3 \times 10^{-5}$ M).

### **III.IV.3. Reducción en la $[Ca^{2+}]_i$ y fuerza contráctil inducida por NPS en arterias pulmonares de lechón contraídas con NA y U46619.**

Después de 4-6 horas de incubación con fura-2, las arterias eran montadas para el registro simultáneo de la contractilidad y la  $[Ca^{2+}]_i$ . Tras un período de estabilización de unos 30 minutos, se añadían 80 mM de KCl al baño, lo que producía un aumento mantenido de la fuerza y de la  $[Ca^{2+}]_i$ . A continuación, se lavaban las preparaciones con solución Krebs hasta que las respuestas de fuerza y  $[Ca^{2+}]_i$  alcanzaban niveles basales y, posteriormente, se estimulaban con NA o U46619 hasta alcanzar una respuesta estable. En este momento, se añadían dosis acumulativas de NPS.

### **III.IV.4. Estudio de diversos pretratamientos sobre la vasodilatación inducida por el NPS y el SNAP en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón.**

En estos experimentos, las arterias fueron contraídas con NA y, una vez que la respuesta vasoconstrictora alcanzaba valores estables, eran relajadas tras la adición de concentraciones acumulativas de NPS o SNAP. Algunos anillos estimulados con NA fueron, posteriormente, tratados con ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona,  $10^{-6}$  M), un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble. En otro grupo de experimentos, las arterias fueron sometidas a distintos tratamientos antes de la exposición a NA:

1. Solución carente de  $K^+$  extracelular ( $0K^+$ , ver Tabla 2) o ouabaina ( $10^{-5}$  M), con el fin de inhibir la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$  de la membrana.
2. Solución con 80 mM de KCl (alto KCl, ver Tabla 2) para bloquear el flujo de salida de  $K^+$  y, posteriormente, nifedipino ( $10^{-6}$  M), para bloquear el flujo de entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo-L.
3. Tapsigargina ( $2 \times 10^{-6}$ M), un inhibidor de la SERCA, durante 20-30 minutos. Estos experimentos también se realizaron en baños de órganos acoplados al fluorímetro, si bien, en este caso los anillos sólo se expusieron a tapsigargina 10 minutos antes de ser estimulados con NA.

### **III.IV.5. Estudio de la interacción del U46619 con la vía NO/GMPc en arterias pulmonares.**

Estos experimentos se realizaron en el baño de órganos acoplado al fluorímetro. Las arterias fueron estimuladas inicialmente con 80 mM de KCl, expresándose los cambios posteriores en fuerza y  $[Ca^{2+}]_i$ , como porcentaje de esta respuesta. Tras la fase de lavado, las arterias fueron tratadas con estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) durante 20-30 minutos antes de ser estimuladas con U46619. En estudios previos habíamos observado que la estaurosporina reduce la respuesta contráctil inducida por el U46619 (Pérez-Vizcaino y cols., 1997); por ello, en estos experimentos se elevó la concentración de U46619 hasta 2 ó 3 x  $10^{-7}M$ , lo que nos permitía alcanzar una respuesta contráctil equivalente a la obtenida en ausencia de estaurosporina. Posteriormente, los anillos fueron tratados con dosis acumulativas de NPS.

### **III.IV.6. Estudio de la vasodilatación inducida por levcromakalim, nicorandil y verapamil en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619.**

En este grupo de experimentos, las arterias eran contraídas con NA o U46619 y, posteriormente, se relajaban con levcromakalim ( $10^{-8}$ - $10^{-5}M$ ), un agonista de canales  $K_{ATP}$ , con nicorandil ( $10^{-7}$ - $3 \times 10^{-4}M$ ), un agente con actividad agonista de canales  $K_{ATP}$  y dadora de NO o con verapamil ( $10^{-8}$ - $10^{-4}M$ ), un bloqueante de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L.

### **III.IV.7. Estudio de la vasodilatación inducida por NPS, levcromakalim y nicorandil.**

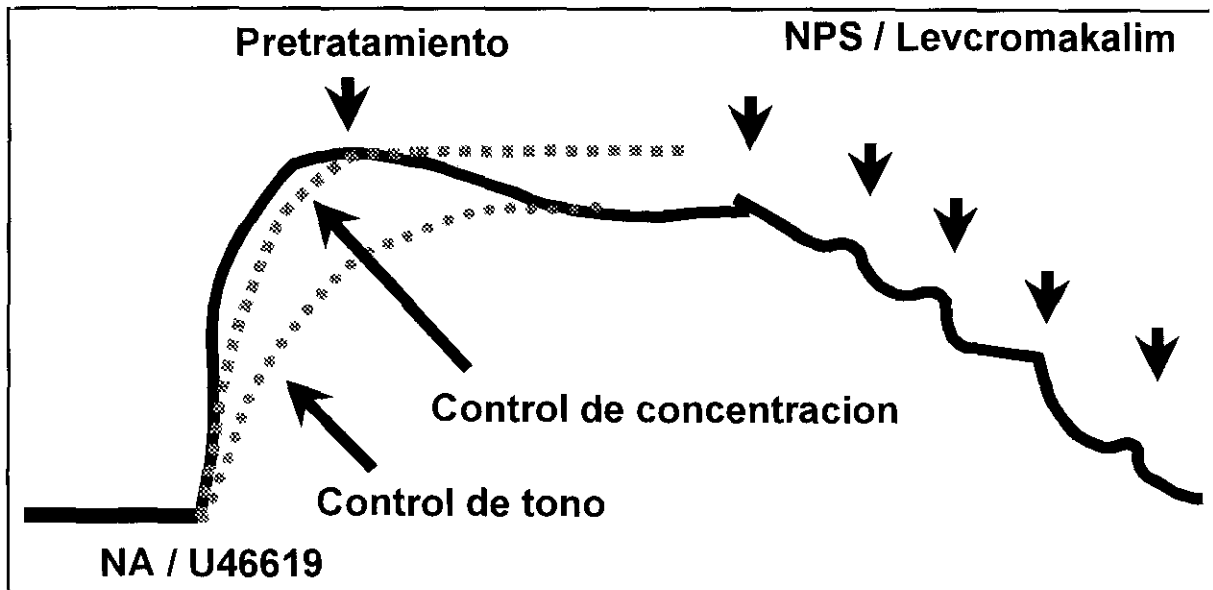
Tras la contracción con NA o U46619, las arterias eran tratadas durante 20 minutos con ODQ ( $10^{-6}M$ ), glibenclamida ( $10^{-5}M$ ) o con ambos fármacos, antes de inducir la vasodilatación con concentraciones crecientes de NPS, levcromakalim o nicorandil. Sin embargo, la glibenclamida es un inhibidor competitivo de los receptores de tromboxano  $A_2$  (Cocks y cols., 1990), por lo que producía una respuesta vasodilatadora (30-50 %) en las arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $10^{-7}M$ ). Este es el motivo por el que en arterias pulmonares tratadas con glibenclamida, se aumentaba la concentración de U46619 hasta 3 x  $10^{-7}M$ . En estas condiciones, la glibenclamida producía una relajación del 26 %, de forma que el tono pulmonar resultante no era significativamente distinto del inducido con  $10^{-7}M$  de U46619. En arterias mesentéricas contraídas con U46619 ( $10^{-6}M$ ), la glibenclamida producía mínimos efectos relajantes (< 15 %) y, por ello, no fue necesario aumentar la concentración de U46619.

### **III.IV.8. Estudio de la vasodilatación inducida por la combinación de NPS y levcromakalim.**

Estos experimentos se diseñaron para evaluar la relajación inducida por la combinación de NPS y levcromakalim y la existencia de interacciones entre ambos. Se relizaron dos tipos de protocolos.

*Protocolo 1.* En estos experimentos se analizó la vasodilatación inducida por NPS en presencia

de una dosis única de levcromakalim y viceversa. Las dosis únicas se eligieron de forma que produjeran una relajación del 20-35%. Este estudio se realizó en arterias mesentéricas contraídas con NA ( $3 \times 10^{-6}\text{M}$ ) y en arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $10^{-6}\text{M}$ ). Cuando la respuesta vasoconstrictora alcanzó un nivel estable, algunos anillos fueron tratados con una dosis única de levcromakalim ( $3 \times 10^{-7}\text{M}$  en arterias pulmonares y  $3, 5$  ó  $7 \times 10^{-7}\text{M}$  en las mesentéricas) y, a continuación, relajados con dosis acumulativas de NPS. En otra serie de experimentos se llevó a cabo el diseño opuesto, es decir, las arterias fueron tratadas con una dosis única de NPS ( $3 \times 10^{-7}\text{M}$  y  $3 \times 10^{-8}\text{M}$  en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente) y, a continuación, relajadas con dosis acumulativas de levcromakalim. Los resultados se compararon con los de las curvas concentración-respuesta obtenidos en ausencia de pretratamiento en (Fig 6): a) arterias contraídas con la misma concentración de NA o U46619 (control de concentración) y b) arterias contraídas con una concentración del agonista ( $10^{-6}\text{M}$  de NA en arterias mesentéricas y  $10^{-7}\text{M}$  de U46619 en arterias pulmonares) que producía un tono similar al inducido por la combinación del agonista más el pretratamiento (control de tono).



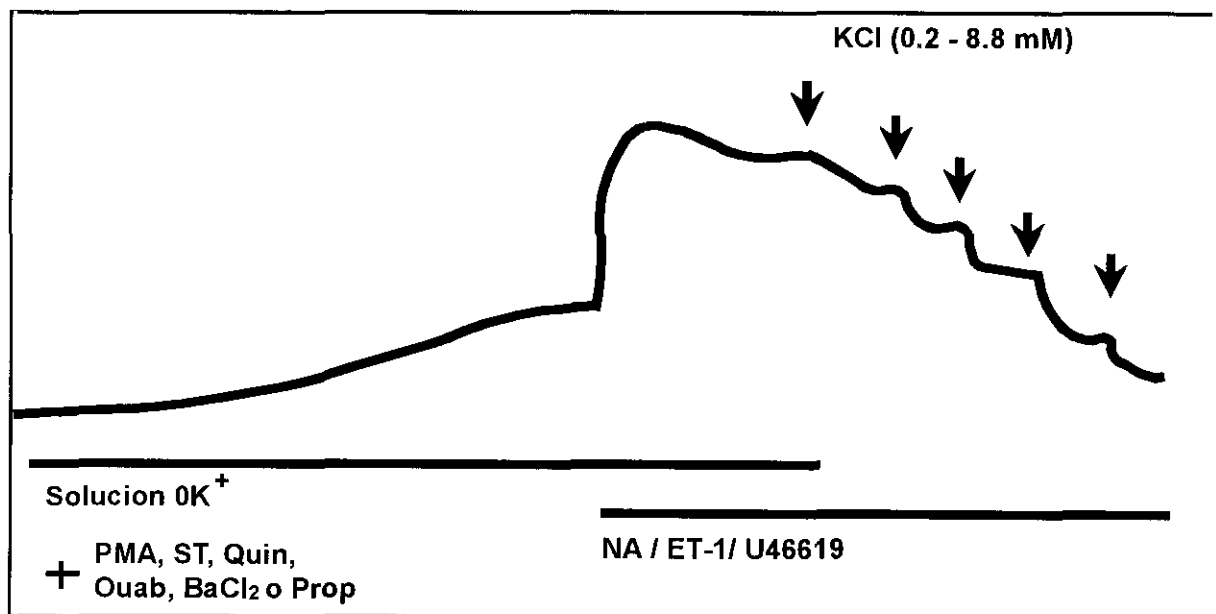
**Figura 6.** Esquema representativo del protocolo empleado para estudiar la vasodilatación de la combinación del NPS y una dosis única del levcromakalim y viceversa en arterias estimuladas con NA o U46619. Pretratamiento es la adición de la dosis única de un agente vasodilatador antes del tratamiento con dosis acumulativas del otro. Se realizaron controles paralelos de concentración (con la misma concentración del agente vasoconstrictor) y de tono (con una concentración del agente vasoconstrictor que producía un tono similar al obtenido tras el pretratamiento).

*Protocolo 2.* En esta serie de experimentos las arterias pulmonares contraídas con U46619 fueron relajadas por la combinación de NPS y levcromakalim (1:1). A partir de las curvas de relajación para el NPS, el levcromakalim y la combinación (1:1) se confeccionó un isoblograma, que es una representación gráfica que permite caracterizar el efecto obtenido tras la combinación de dos

fármacos (Gessner, 1995; Tallarida y cols., 1989). Un isoblograma presenta en sus ejes las concentraciones de cada fármaco y los puntos que en él se representan dan lugar a isobolas. Cada isobola está formada por los puntos obtenidos a partir de las concentraciones de cada fármaco necesarias para producir un efecto con la misma eficacia. La línea recta que corta los ejes a nivel de la concentración de cada fármaco necesaria para producir el mismo efecto es la denominada "línea de aditividad". Cuando los puntos de una isobola se sitúan en la línea de aditividad no existen interacciones y, por lo tanto, la acción de ambos fármacos es aditiva. Por el contrario, cuando la isobola se sitúa por encima o por debajo de la línea de aditividad existe potenciación o antagonismo entre ambos fármacos, respectivamente.

### III.IV.9. Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en solución $0K^+$ .

Tras un período de estabilización, los anillos se incubaron durante 1 hora en solución  $0K^+$  lo que producía una respuesta contráctil (Fig 7).



**Figura 7.** Esquema representativo del protocolo empleado para estudiar la vasodilatación inducida por el KCl. Las arterias eran incubadas en una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA, U46619, ET-1 o vehículo (control). A continuación, se añadan concentraciones acumulativas del KCl. Algunos anillos fueron tratados con PMA, estaurosporina (ST), quinacrina (Quin), ouabaina (Ouab), BaCl<sub>2</sub> o propanolol (Prop) inmediatamente después de la incubación en la solución  $0K^+$ .

Posteriormente, fueron estimulados con NA ( $10^{-5}$  M en arterias pulmonares y  $10^{-6}$  M en arterias mesentéricas), U46619 ( $10^{-7}$  M en arterias pulmonares y  $10^{-6}$  M en arterias mesentéricas) o ET-1

( $10^{-9}$  M en arterias pulmonares y  $3 \times 10^{-9}$  M en arterias mesentéricas), alcanzándose una respuesta estable al cabo de 20-30 minutos. Las arterias controles (en ausencia del agente vasoconstrictor) fueron incubadas en solución  $0K^{+}$  durante este período de tiempo. En estas condiciones, la adición de KCl (0.2-8.8 mM) produjo una vasodilatación concentración-dependiente (Fig 7), que alcanzó valores estables al cabo de 4-6 minutos. Algunas arterias fueron sometidas a distintos tratamientos inmediatamente después de la exposición a  $0K^{+}$ : 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA,  $10^{-7}$  M), estaurosporina ( $10^{-7}$  M), ouabaína ( $10^{-5}$  M), quinacrina ( $2 \times 10^{-5}$  M, un inhibidor de la fosfolipasa  $A_2$ ) o propranolol ( $10^{-6}$  M), un bloqueante  $\beta$ -adrenérgico.

#### **III.IV.10. Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación y la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en una solución $0K^{+}$ .**

Los protocolos empleados fueron similares a los descritos en el apartado anterior, pero para evitar una pérdida excesiva de fura-2 se redujo el tiempo total de cada experimento. Así, tras un período de estabilización (30-40 minutos) y exposición a 80 mM de KCl, los anillos fueron expuestos a una solución  $0K^{+}$  durante 30 minutos y, posteriormente estimulados con NA, U46619 o ET-1 ( $3 \times 10^{-9}$  M) durante otros 10-15 minutos. Finalmente, se añadían concentraciones acumulativas de KCl (0.4-8.8 mM). Algunos anillos fueron tratados con PMA ( $10^{-7}$  M), inmediatamente después de la exposición a la solución  $0K^{+}$ .

#### **III.V. FÁRMACOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS**

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado las soluciones que se encuentran en la Tabla 2 y los siguientes fármacos: (-) bitartrato de noradrenalina, cloruro de acetilcolina, U46619 (metil acetato de 9,11-dideoxi-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoximetano-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ), nitroprusiato sódico, glibenclamida, endotelina-1, estaurosporina, PMA (12-miristato, 13-acetato de forbol), propranolol, quinacrina, tapsigargina, cremofor EL, EGTA (ácido etilenoglicol-bis[ $\beta$ -aminoetileter]-N,N,N',N'-tetraacético), ionomicina, cloruro de manganeso y ouabaína (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid), ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona, Tocris Cookson Ltd., Bristol), nifedipino (Bayer, Leverkusen, Alemania), levcromakalim (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Betchworth, Inglaterra), nicorandil (Merck Farma y Química, S.A., Barcelona), SNAP (S-Nitroso N-acetil-D,L-penicilamina, Alexis Corporation, Läufelfingen, Alemania), verapamil (Knoll AG, Ludwigshafen, Alemania) y fura-2 AM (1 mM disuelto en dimetil sulfóxido, Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Las soluciones madre de todos estos fármacos se prepararon en agua destilada y desionizada (excepto estaurosporina, quinacrina, PMA, tapsigargina, ODQ y glibenclamida que se disolvieron en dimetil sulfóxido y la ionomicina en etanol), realizándose las diluciones posteriores en solución de Krebs. La combinación de NPS y levcromakalim (1:1) (mol:mol) se preparó añadiendo idéntico volumen de la solución madre de la misma concentración de NPS y levcromakalim y las siguientes diluciones se realizaron en solución Krebs normal.

**Tabla 2.** Composición (mM) de las soluciones nutricias empleadas en esta Tesis Doctoral.

Soluciones	NaCl	KCl	NaHCO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	glucosa
Krebs normal	118	4.75	25	1.2	2	0	1.2	11
0K <sup>+</sup>	118	0	25	1.2	2	1.2	0	11
Alto KCl	38	80	25	1.2	2	0	1.2	11

### III.VI. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media (e.s.m.) para un determinado número (n) de arterias de distintos animales. Las curvas concentración-respuesta se ajustan a la siguiente ecuación logística:

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - pD_2)}}$$

donde E es el efecto relajante del fármaco, E<sub>max</sub> es el efecto máximo relajante (un índice de la eficacia relativa del agente vasodilatador) que se expresa como porcentaje de la respuesta contráctil inicial, k es un factor que representa la pendiente de la curva y pD<sub>2</sub> es la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50% del E<sub>max</sub> (CE<sub>50</sub>), expresado como logaritmo negativo de dicha concentración (un índice de la potencia del agente vasodilatador). Estos parámetros fueron calculados a partir de las curvas concentración-respuesta ajustadas en cada experimento.

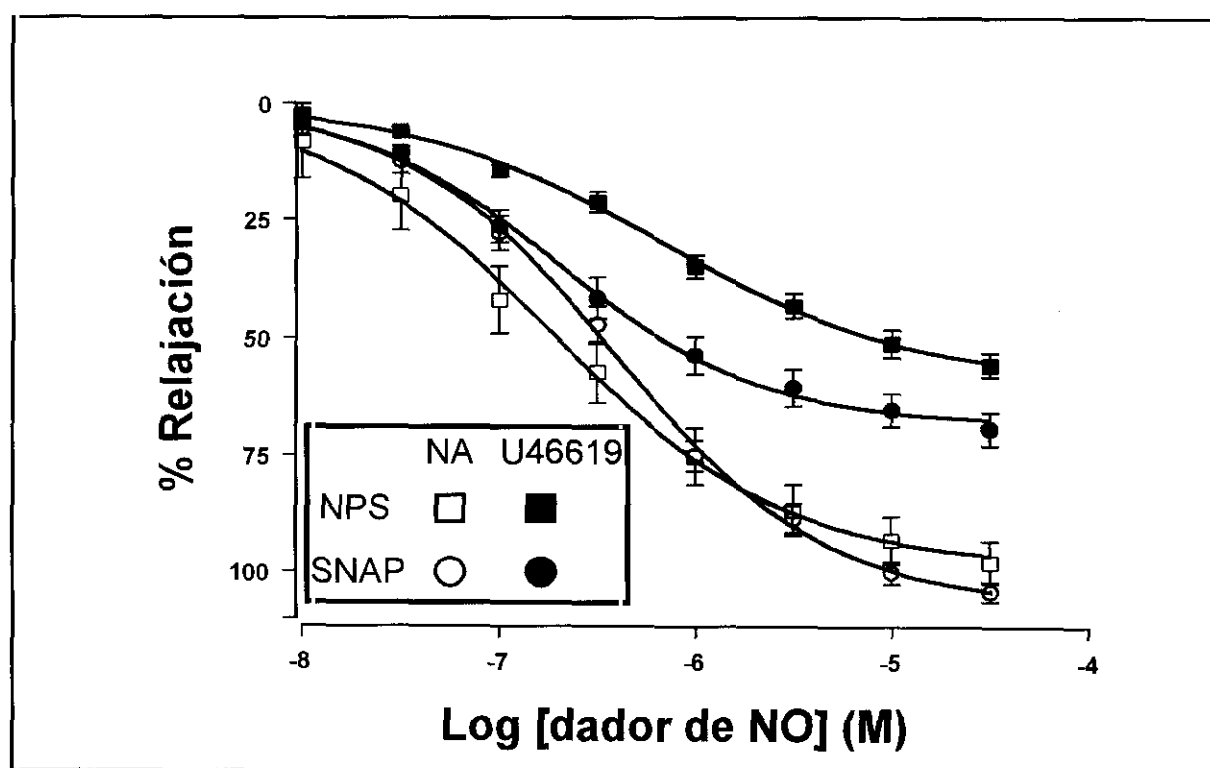
El desplazamiento hacia la derecha de la curva de relajación a nicorandil inducido por ODQ, glibenclamida o su combinación se expresó como el log CR (log dose-ratio), siendo CR el cociente entre la CE<sub>50</sub> obtenida en presencia y en ausencia del antagonista. La potencia de la acción inhibitoria de estos agentes se expresó como el log CR en lugar de utilizar un parámetro más común como el pK<sub>B</sub> (pK<sub>B</sub> = -log [inhibidor] + log (CR-1)), porque el log CR permite la determinación de la inhibición producida por la combinación de ambos inhibidores.

Para el tratamiento estadístico se utilizaron los paquetes informáticos Microsoft Excel versión 4.0. y Pharmacological Calculation System (Tallarida). Se contrastaron los resultados experimentales y controles comparando las medias mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Newman Keuls. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que P fue menor de 0.05. La interacción entre NPS y levromakalim se evaluó mediante un análisis isoblográfico utilizando la combinación (1:1) de ambos fármacos (Gessner, 1995). El análisis estadístico de la desviación de la línea de aditividad en el isoblograma se realizó como ha sido descrito por Tallarida y cols (1989).

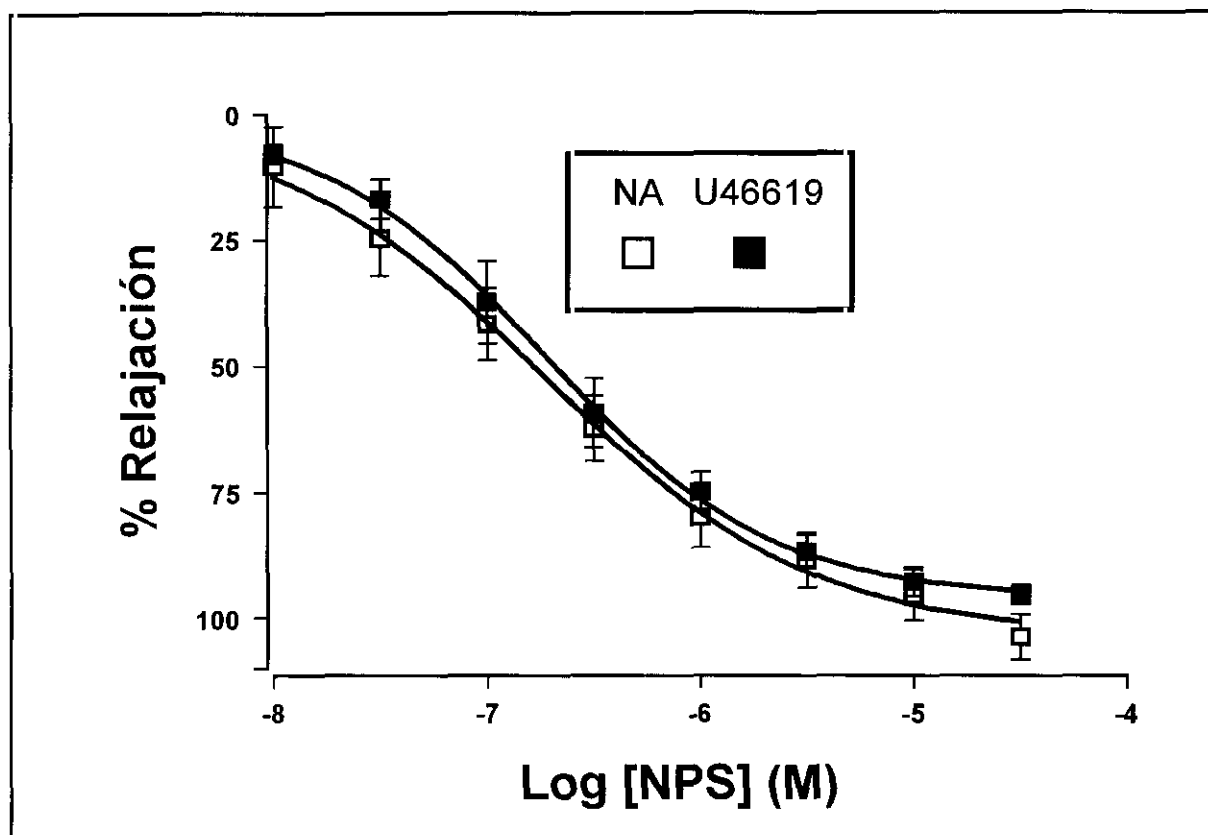
## ***IV. RESULTADOS***

#### IV.I. Vasodilatación inducida por NPS y SNAP en arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con NA y U46619.

En arterias pulmonares, el tratamiento con NA ( $10^{-5}$ M) y U46619 ( $10^{-7}$ M) produjo una respuesta vasoconstrictora estable de  $904 \pm 52$  mg ( $n = 70$ ) y  $983 \pm 61$  mg ( $n = 51$ ), respectivamente. En arterias mesentéricas, la respuesta contráctil inducida por la NA y el U46619 (ambos a la concentración de  $10^{-6}$ M) alcanzó valores de  $1735 \pm 142$  mg ( $n = 35$ ) y  $2096 \pm 207$  mg ( $n = 23$ ), respectivamente. En estas condiciones, la adición de concentraciones acumulativas de NPS ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$ M) o de SNAP ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$ M) produjo una vasodilatación concentración-dependiente tanto de las arterias pulmonares (Fig 8) como de las mesentéricas (Fig 9). Esta respuesta vasodilatadora alcanzaba valores estables al cabo de 3-5 minutos. Los valores de potencia ( $pD_2$ ) y eficacia ( $E_{max}$ ) para la vasodilatación inducida por NPS y SNAP en arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con NA y U46619 se encuentran en la Tabla 3.



**Figura 8.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS y el SNAP en arterias pulmonares contraídas con NA o U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 11-25$ ).



**Figura 9.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en arterias mesentéricas contraídas con NA o U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 6-7$ ).

En arterias pulmonares, ambos dadores de NO relajaron de forma completa las arterias precontraídas con NA, mientras que mostraron una menor eficacia vasodilatadora en aquéllas precontraídas con U46619 (Fig 8). Además, el NPS relajó de forma más potente los anillos precontraídos con NA que con U46619 ( $P < 0.01$ ), si bien no se observaron diferencias en los valores de  $pD_2$  en el caso del SNAP. El NPS presentó valores similares de  $pD_2$  en arterias mesentéricas contraídas con NA y U46619 pero produjo un  $E_{max}$  ligeramente superior (pero estadísticamente significativo,  $p < 0.01$ ) en las estimuladas con NA. Los valores de  $pD_2$  del NPS fueron similares en arterias pulmonares y mesentéricas estimuladas con NA (Tabla 3). En resumen, el NPS y el SNAP relajaron con menor eficacia las arterias pulmonares contraídas con U46619 que el resto de las condiciones experimentales estudiadas.

**Tabla 3.** Vasodilatación inducida por NPS, SNAP, levcromakalim y nicorandil en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619. Se muestran los valores de potencia ( $pD_2$ ) y eficacia ( $E_{max}$ ) de la relajación de estos agentes vasodilatadores.

Agentes vasodilatadores	NA			U46619		
	n	$pD_2$	$E_{max}$	n	$pD_2$	$E_{max}$
<b>ARTERIAS PULMONARES</b>						
SNP	25	$6.66 \pm 0.08$	$101 \pm 3$	20	$6.19 \pm 0.1 \##$	$66 \pm 2 \##$
SNAP	11	$6.4 \pm 0.08$	$107 \pm 2$	13	$6.59 \pm 0.11$	$69 \pm 3 \##$
Levcromakalim	6	$6.8 \pm 0.1$	$59 \pm 7$	6	$6.5 \pm 0.2$	$58 \pm 5$
Nicorandil	7	$4.8 \pm 0.1$	$112 \pm 4$	6	$4.8 \pm 0.1$	$104 \pm 4$
<b>ARTERIAS MESENTÉRICAS</b>						
SNP	6	$6.55 \pm 0.2$	$106 \pm 3$	7	$6.7 \pm 0.1^*$	$95 \pm 2^{*}\##$
Levcromakalim	6	$7.3 \pm 0.1^*$	$97 \pm 3^*$	5	$7.3 \pm 0.1^*$	$98 \pm 3^*$
Nicorandil	6	$5.4 \pm 0.2^*$	$109 \pm 3$	6	$5.2 \pm 0.1^*$	$106 \pm 2$

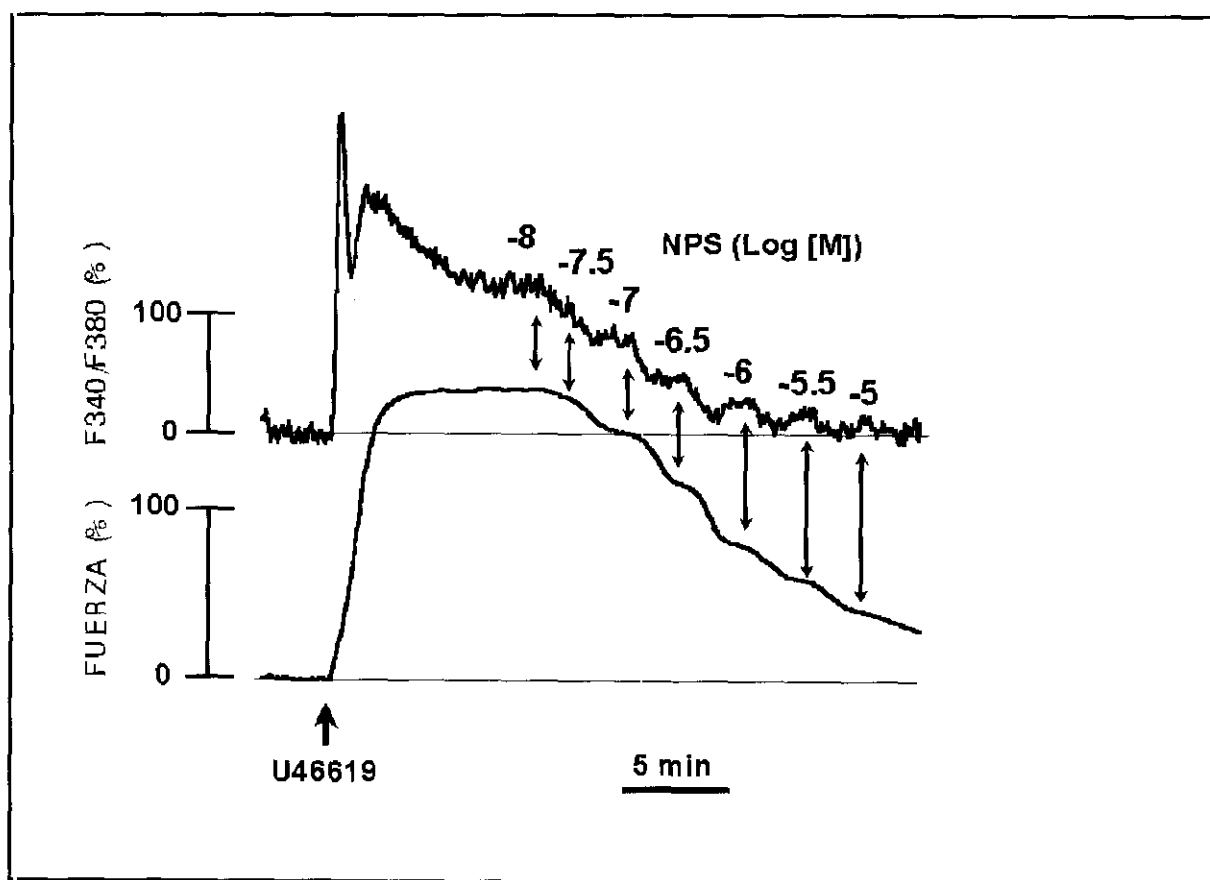
# y ##  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, con respecto a arterias contraídas con NA.

\*  $P < 0.05$  con respecto a arterias pulmonares.

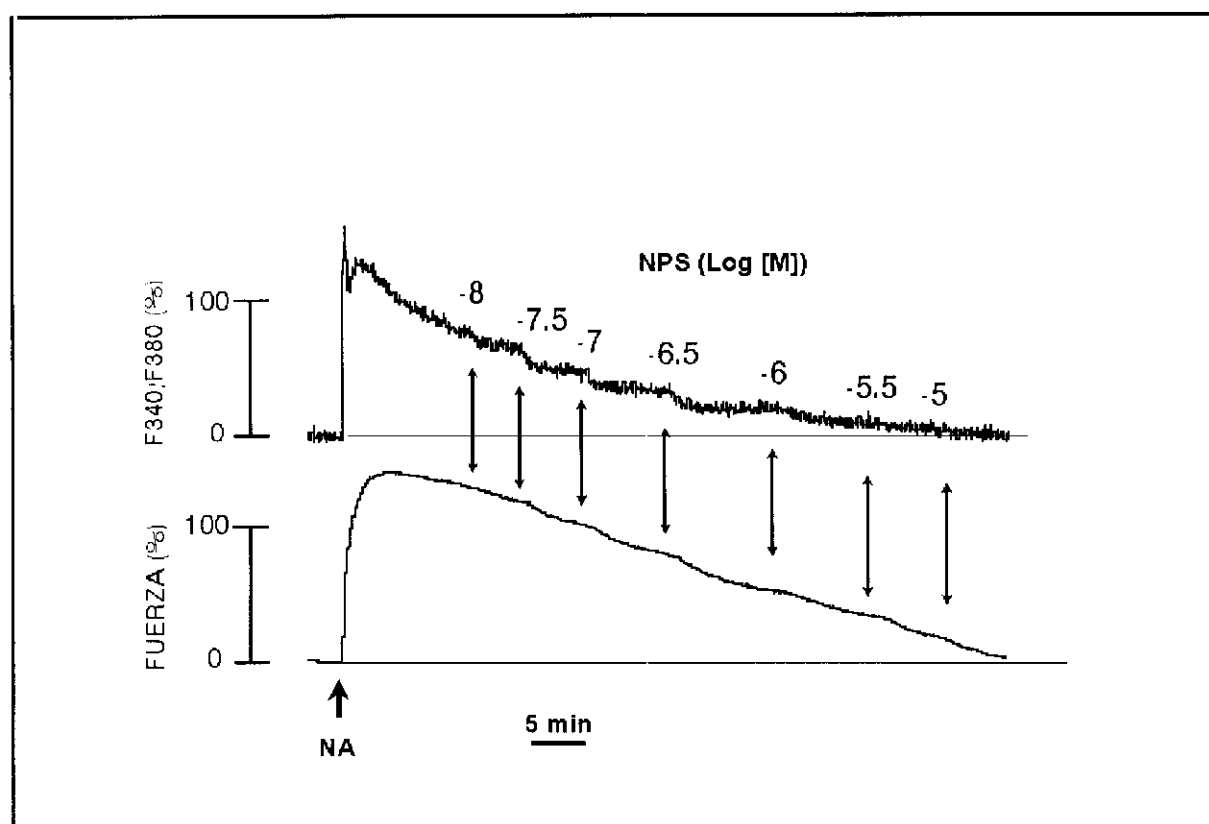
#### IV.II. Reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la fuerza contráctil inducida por NPS en arterias pulmonares de lechón contraídas con NA y U46619.

*Efectos de NA y U46619 sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y fuerza contráctil.* El tratamiento con 80 mM de KCl produjo un aumento del cociente F340/F380 seguido de un efecto vasoconstrictor. El U46619 (Fig 10) y la NA (Fig 11) indujeron un rápido aumento del cociente F340/F380 (respuesta fásica) seguido de una caída lenta hasta alcanzar un nivel estable (respuesta tónica). Esta respuesta tónica alcanzó valores del  $99.7 \pm 10.6\%$  ( $n = 6$ ) y  $79.3 \pm 7.0\%$  ( $n = 9$ ), respectivamente, de la respuesta inducida por 80 mM de KCl en arterias estimuladas con U46619 y NA ( $P > 0.05$  U46619 vs NA). En la mayoría de los experimentos, la NA indujo un rápido aumento de la fuerza contráctil que alcanzó su máximo al cabo de 1-2 min (respuesta fásica) y que, posteriormente, disminuyó lentamente hasta alcanzar un nivel estable al cabo de 10 minutos (respuesta tónica), mientras que el U46619 produjo una respuesta vasoconstrictora monofásica de desarrollo más lento. Estas diferencias en el curso temporal de las respuestas a U46619 y NA fueron observadas también en baños de órganos convencionales, confirmando datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Pérez-Vizcaino y cols., 1997). La respuesta tónica contráctil inducida por U46619 y NA alcanzó valores del  $153 \pm 7\%$  ( $n = 6$ ) y  $125 \pm 11\%$  ( $n = 9$ ) de la contracción inicial inducida con 80 mM de KCl ( $P > 0.05$  U46619 vs NA). Por tanto, a las concentraciones utilizadas, no se encontraron

diferencias significativas en los aumentos observados en el cociente F340/F380 y en la fuerza contráctil inducidos por U46619 o NA. Además, la relación fuerza-F340/F380 [(% del aumento en fuerza )/(% del aumento en el cociente F340/F380) de la respuesta a 80 mM de KCl] fue similar para U46619 y NA ( $1.63 \pm 0.18$  y  $1.74 \pm 0.22$ , respectivamente), lo que indicaba que para aumentos similares del cociente F340/F380 ambos agonistas inducían una mayor respuesta contráctil que la producida por el KCl.

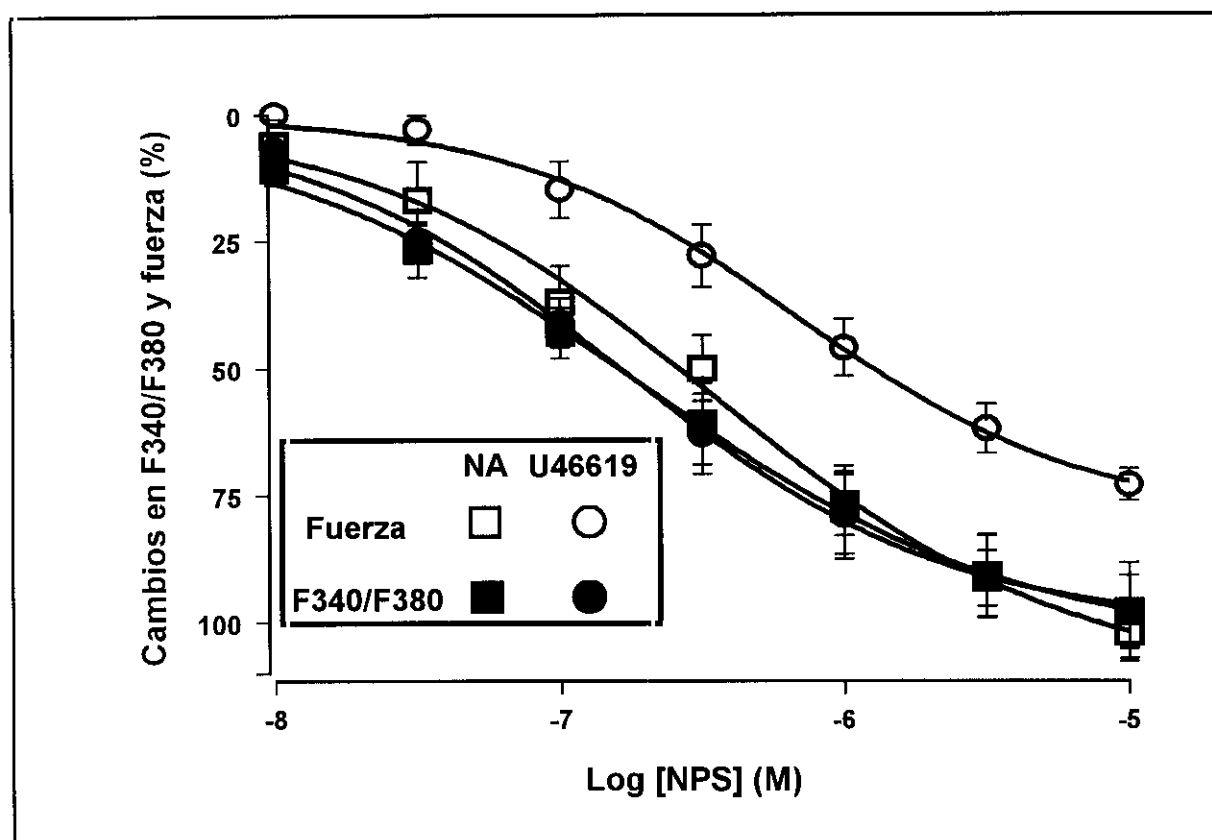


**Figura 10.** Registro simultáneo de los cambios en la fuerza contráctil y en la  $[Ca^{2+}]_i$ , expresada como el cociente F340/F380 inducidos por el NPS en una arteria pulmonar estimulada con U46619 ( $10^{-7}M$ ).



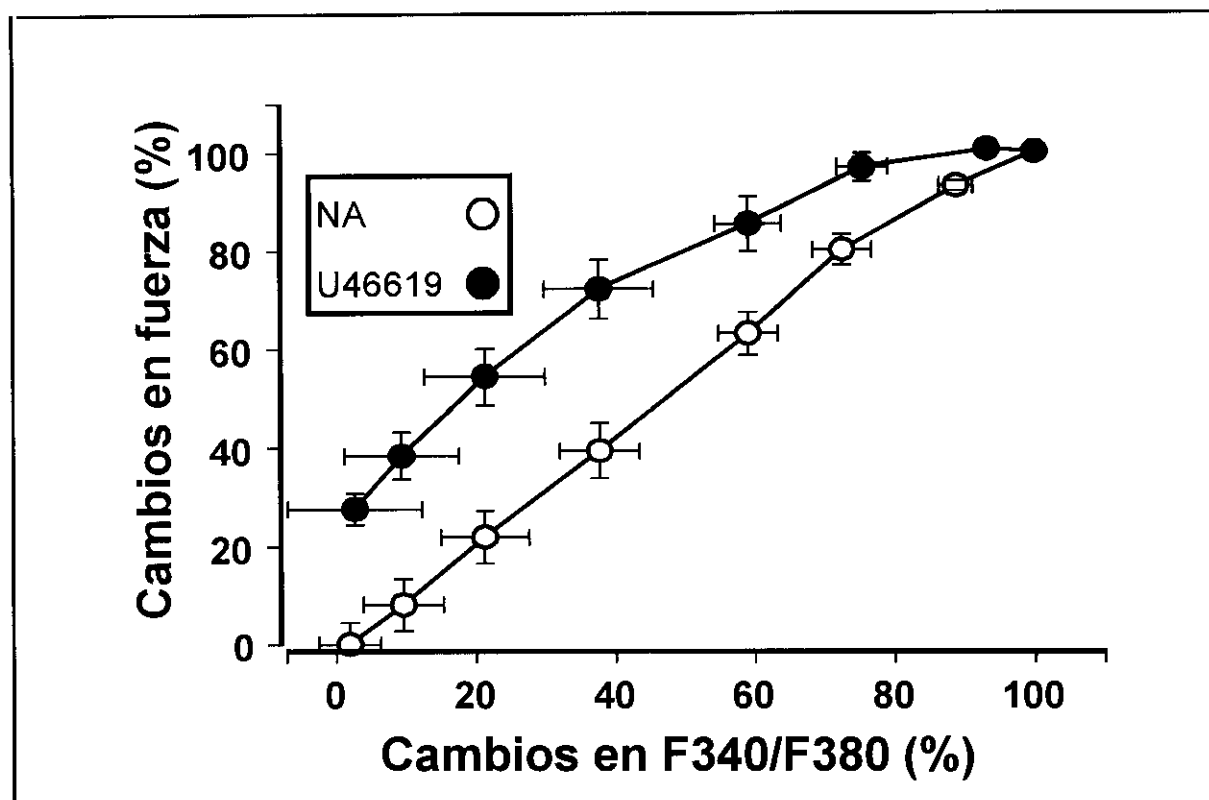
**Figura 11.** Registro simultáneo de los cambios en la fuerza contráctil y en la  $[Ca^{2+}]_i$  expresada como el cociente F340/F380 inducidos por el NPS en una arteria pulmonar estimulada con NA ( $10^{-5}M$ ).

*Efectos del NPS sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la fuerza contráctil.* Las Figs 10 y 11 muestran los efectos del NPS sobre el cociente F340/F380 y la fuerza contráctil en arterias pulmonares estimuladas con U46619 y NA, respectivamente. La adición de NPS produjo una reducción concentración-dependiente en el cociente F340/F380 y en la fuerza contráctil. Al igual que ocurría en los baños convencionales, la Fig 12 muestra que el NPS relajó completamente las arterias contraídas con NA ( $E_{max} = 105 \pm 4\%$ ,  $pD_2 = 6.59 \pm 0.09$ ), mientras que sólo de forma parcial ( $E_{max} = 75 \pm 4\%$ ,  $p < 0.01$  con respecto a arterias estimuladas con NA) y con menor potencia ( $pD_2 = 6.2 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$  con respecto a arterias estimuladas con NA) aquéllas contraídas con U46619. Por el contrario, el NPS redujo de forma completa y con igual potencia el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por NA y U46619 ( $pD_2 = 6.7 \pm 0.07$  y  $6.7 \pm 0.1$ , respectivamente) (Fig 12). Por tanto, en los anillos estimulados con NA, el NPS redujo el cociente F340/F380 y la fuerza contráctil de forma paralela, presentando valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  muy similares, mientras que se observó una disociación entre ambos efectos en las arterias estimuladas con U46619.



**Figura 12.** Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (F340/F380) y fuerza contráctil inducidos por el NPS en arterias contraídas con NA o U46619, expresados como porcentaje de la máxima respuesta del agente vasoconstrictor. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).

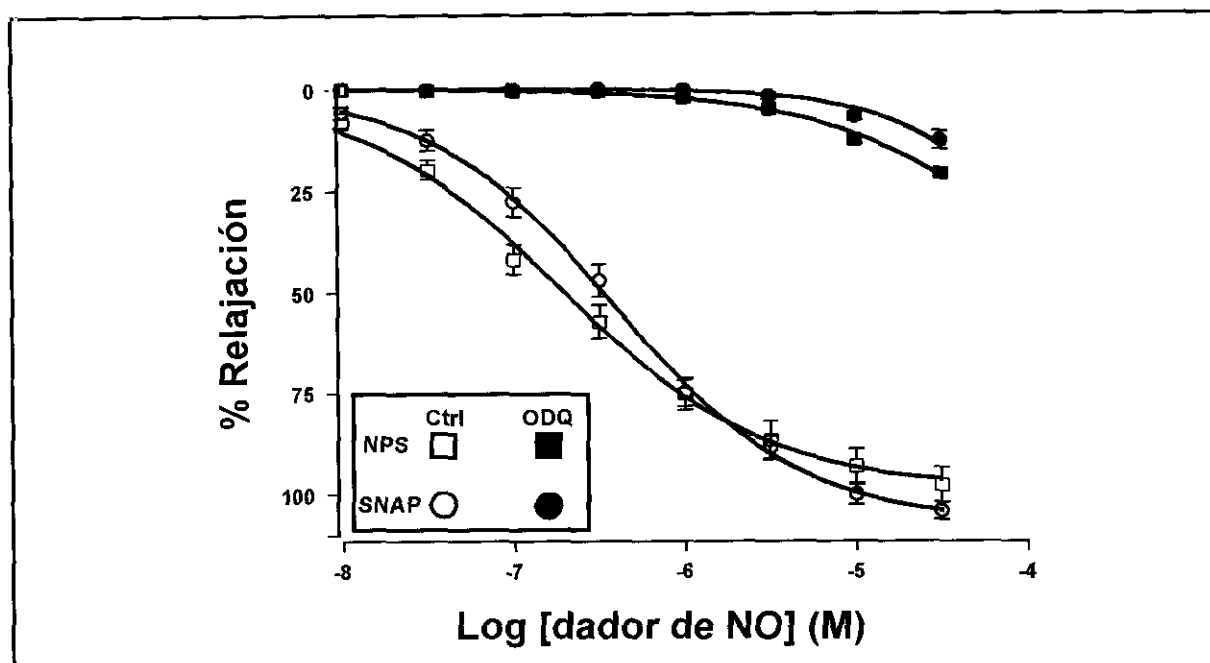
En la Fig 13 se muestra la relación fuerza-F340/F380 obtenida tras dosis acumulativas de NPS en arterias estimuladas con NA y U46619. En presencia de U46619, la relación fuerza-F430/F380 está desplazada a la izquierda con respecto a la obtenida en arterias contraídas con NA; es decir, que para niveles similares de reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$ , el NPS produce una menor reducción de la fuerza contráctil en arterias contraídas con U46619 que en aquellas contraídas con NA.



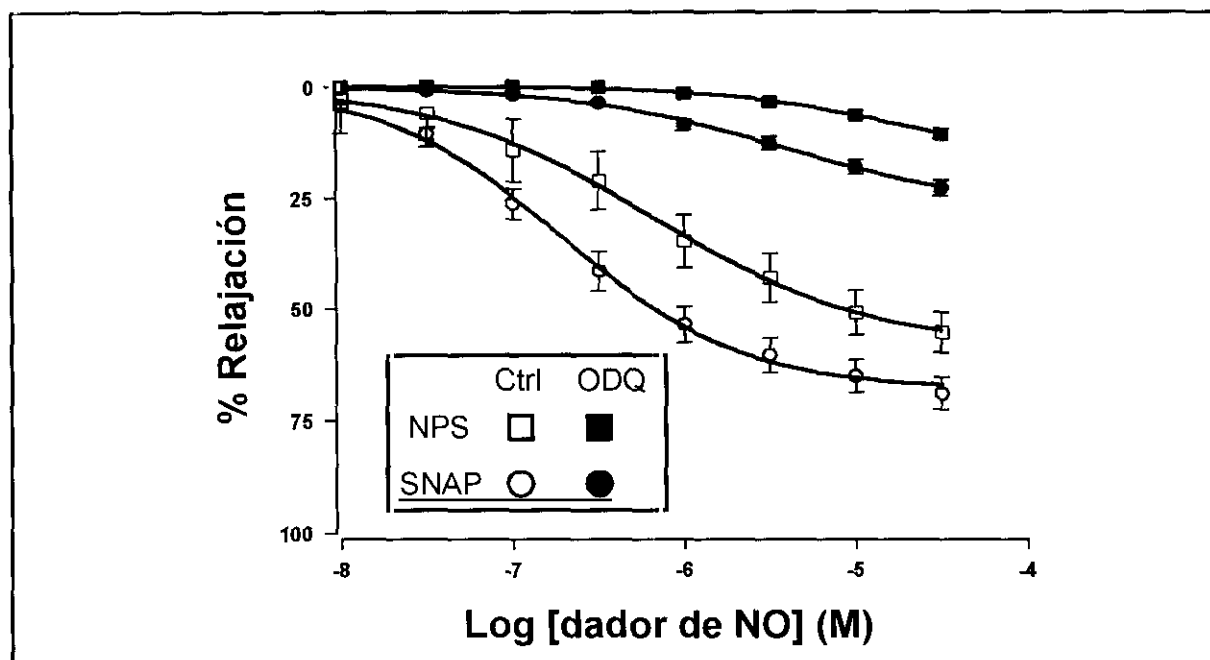
**Figura 13.** Relación fuerza- $[Ca^{2+}]_i$  de la respuesta inducida por el NPS en arterias contraídas con NA o U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).

#### IV.III. Estudio de los posibles mecanismos implicados en la relajación producida por NPS y SNAP en arterias pulmonares y mesentéricas.

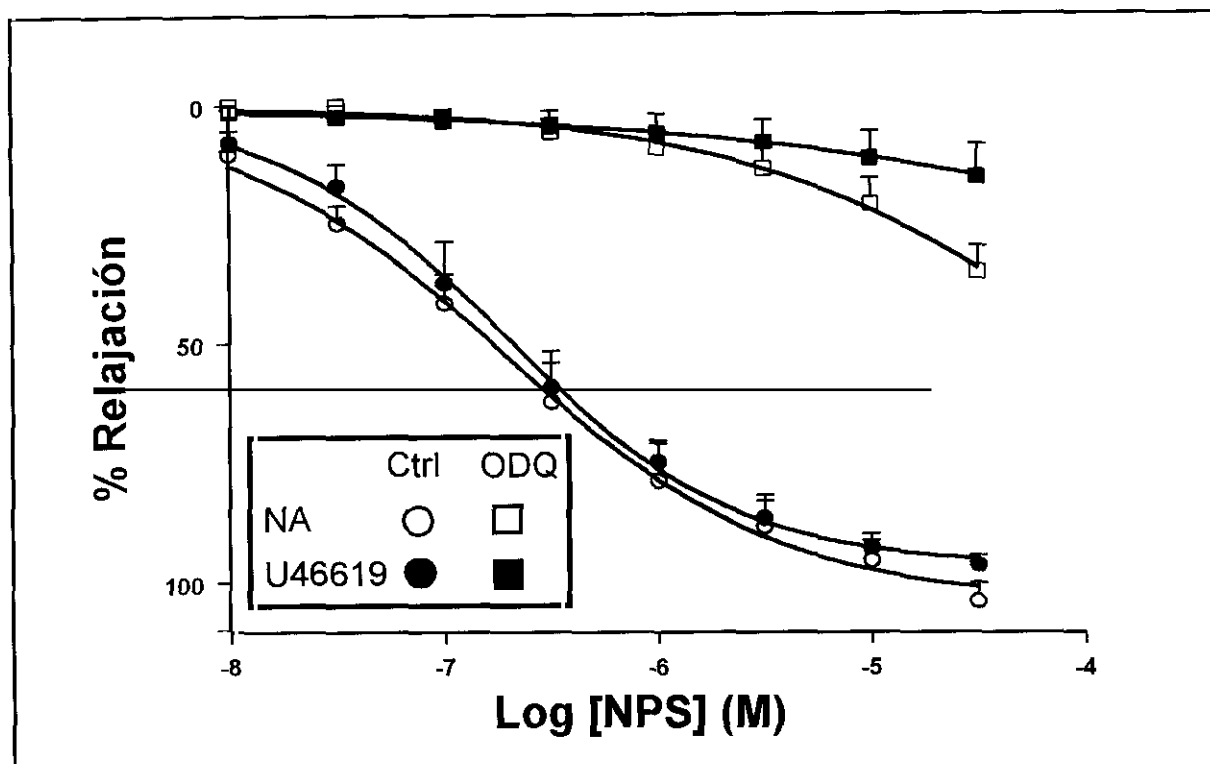
*Papel de la guanilato ciclasa soluble.* En arterias pulmonares precontraídas con NA o U46619, la adición de ODQ ( $10^{-6}$  M), un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, produjo una pequeña respuesta contráctil, que en ningún caso superó el 10% de la inducida por ambos agentes vasoconstrictores. Sin embargo, a esta concentración, el ODQ inhibió marcadamente la relajación inducida por el NPS (n=6-8) y el SNAP (n = 6-11) en arterias pulmonares contraídas con NA (Fig 14) o U46619 (Fig 15). En arterias mesentéricas contraídas con NA, el tratamiento con ODQ también inhibió marcadamente la relajación inducida por el NPS (Fig 16). Estos resultados indican que en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón, ambos dadores de NO ejercen sus efectos principalmente a través de la estimulación de la guanilato ciclasa y el posterior aumento de los niveles intravasculares de GMPC.



**Figura 14.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS y el SNAP en ausencia (Ctrl) y presencia del ODQ en arterias pulmonares contraídas con NA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 6-25).



**Figura 15.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS y el SNAP en ausencia (Ctrl) y presencia del ODQ en arterias pulmonares contraídas con U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 6-20).



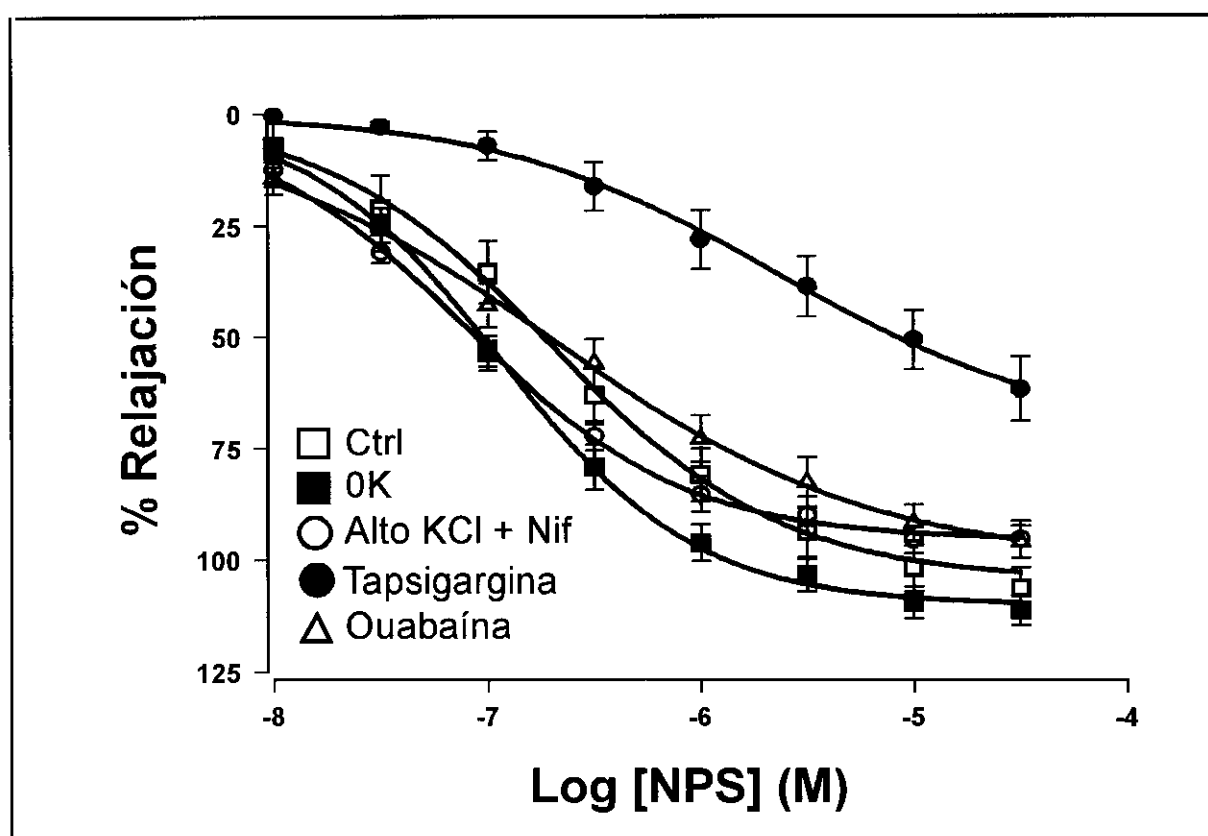
**Figura 16.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en ausencia (Ctrl) y presencia del ODQ en arterias mesentéricas contraídas con NA o U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-7)

Las Figs 17 y 18 muestran la relajación inducida por el NPS en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente, tras la exposición a diversos tratamientos y la posterior contracción con NA. A continuación se detallan los resultados de estos tratamientos.

*Papel de la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$ .* En arterias pulmonares y mesentéricas en las que se cambiaba el medio de incubación de Krebs normal a una solución  $0K^+$  e inmediatamente después se estimulaban con NA se obtuvo una respuesta vasoconstrictora de  $977 \pm 111$  mg (n = 9) y  $1143 \pm 265$  mg (n = 8), respectivamente. Esta respuesta no fue significativamente diferente a la obtenida en arterias expuestas a solución de Krebs normal. Sin embargo, el tratamiento con la solución  $0K^+$  inhibió la relajación inducida por NPS en arterias mesentéricas ( $E_{max} = 82 \pm 6\%$  y  $pD_2 = 5.89 \pm 0.27$ ,  $P < 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente, con respecto a arterias control, Fig 18), mientras que la potenció en arterias pulmonares ( $pD_2 = 6.89 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ , Fig 17).

El tratamiento durante 20-30 minutos con ouabaína, un inhibidor de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , produjo una respuesta contráctil de  $321 \pm 100$  mg (n = 6) y  $351 \pm 145$  mg (n = 4) en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente. La ouabaína, al igual que la solución  $0K^+$ , no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por la NA, pero desplazó a la derecha

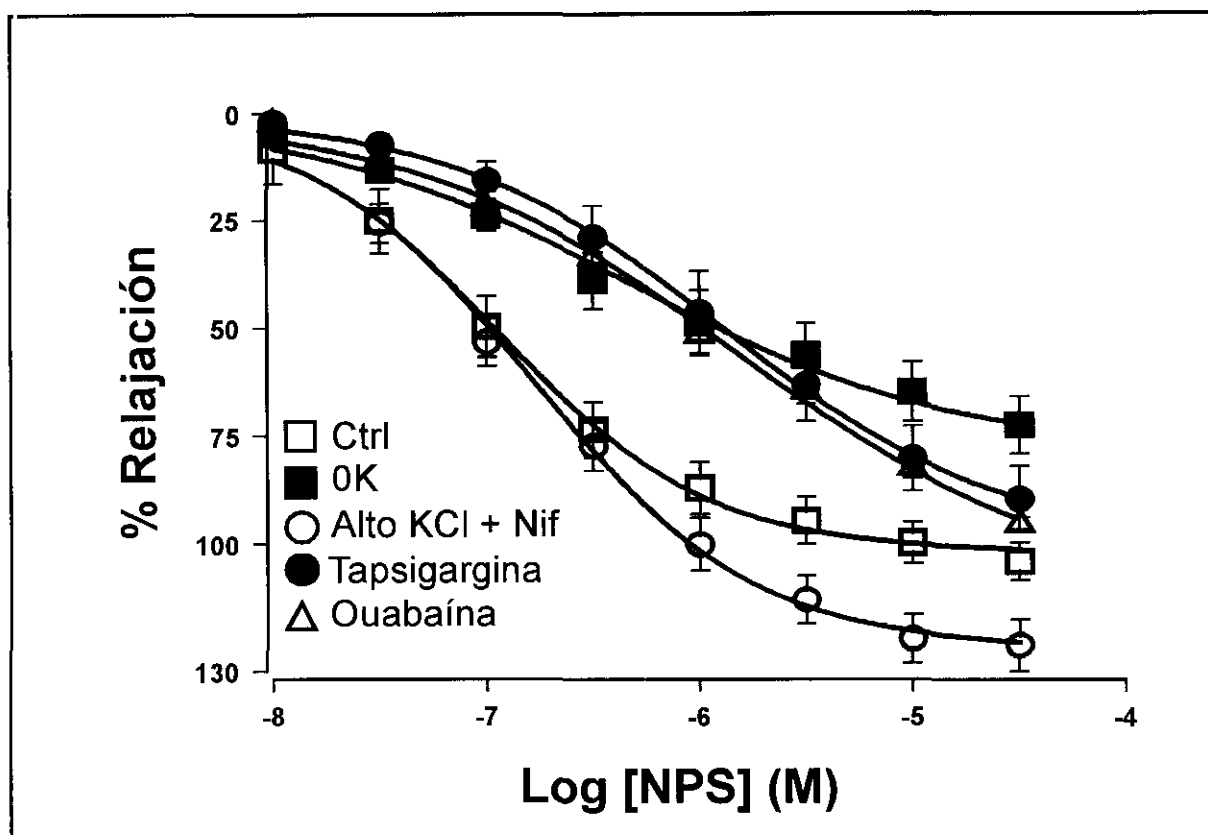
la curva de relajación a NPS en arterias mesentéricas ( $pD_2 = 5.82 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ), mientras que no la afectó en arterias pulmonares ( $pD_2 = 6.67 \pm 0.13$ ,  $P > 0.05$ ) como se observa en las Figs 17 y 18, respectivamente. Estos resultados indican que la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  media parte del efecto vasodilatador del NPS en las arterias mesentéricas pero no en las pulmonares.



**Figura 17.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en arterias pulmonares contraídas con NA en ausencia (Ctrl) o presencia de tratamiento: solución  $0K^+$  (0K), ouabaína, tapsigargina o solución de alto KCl y posterior adición de nifedipino (Alto KCl + Nif). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-9$ ).

*Papel de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y canales de  $K^+$ .* En estos experimentos los anillos eran incubados en una solución Krebs normal y, posteriormente, en una con alto KCl (Tabla 2), lo que produjo una respuesta de  $899 \pm 82$  mg ( $n = 5$ ) y  $1238 \pm 184$  mg ( $n = 4$ ), respectivamente, en arterias pulmonares y mesentéricas. Posteriormente, las arterias fueron totalmente relajadas con nifedipino ( $10^{-6}$  M), un bloqueante de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y, una vez que la respuesta alcanzaba niveles basales, estimuladas con NA, cuya respuesta contráctil fue similar en arterias pulmonares ( $1071 \pm 71$  mg,  $p > 0.05$ ) pero inferior en arterias mesentéricas ( $587 \pm 62$  mg,  $p < 0.05$ ) con respecto a la inducida en arterias sin tratar. Estos

resultados están en concordancia con el hecho de que el verapamil, otro bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, sea más potente en relajar arterias mesentéricas que pulmonares contraídas con NA (ver apartado IV.V). El tratamiento con la solución de alto KCl y nifedipino no inhibió la vasodilatación inducida por el NPS, incluso la potenció en arterias pulmonares ( $\text{pD}_2 = 7.06 \pm 0.05$ ;  $P < 0.05$ , Fig 17) y aumentó su efecto máximo en arterias mesentéricas ( $E_{\text{max}} = 127 \pm 7\%$ , Fig 18). Estos resultados sugieren que ni la activación de canales de  $\text{K}^+$  ni el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  parecen mediar la relajación de NPS en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón.

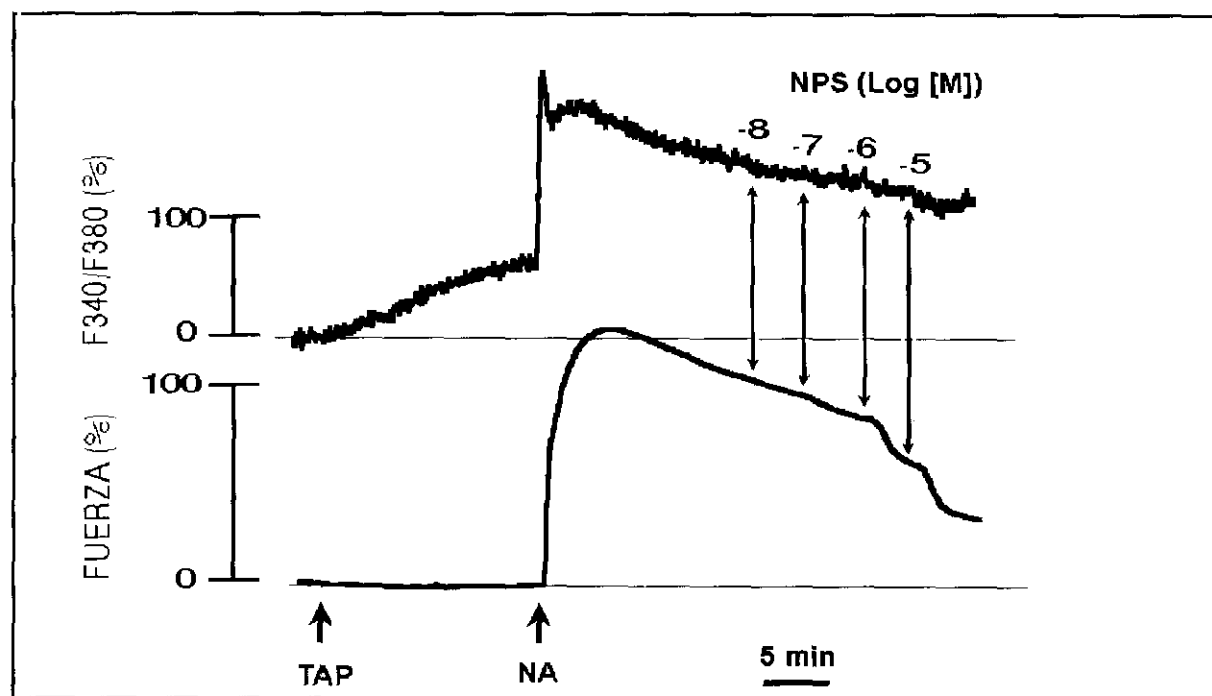


**Figura 18.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en arterias mesentéricas contraídas con NA en ausencia (Ctrl) o presencia de tratamiento: solución  $0\text{K}^+$  (OK), ouabaína, tapsigargina o solución de alto KCl y posterior adición de nifedipino (Alto KCl + Nif). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 4-9$ ).

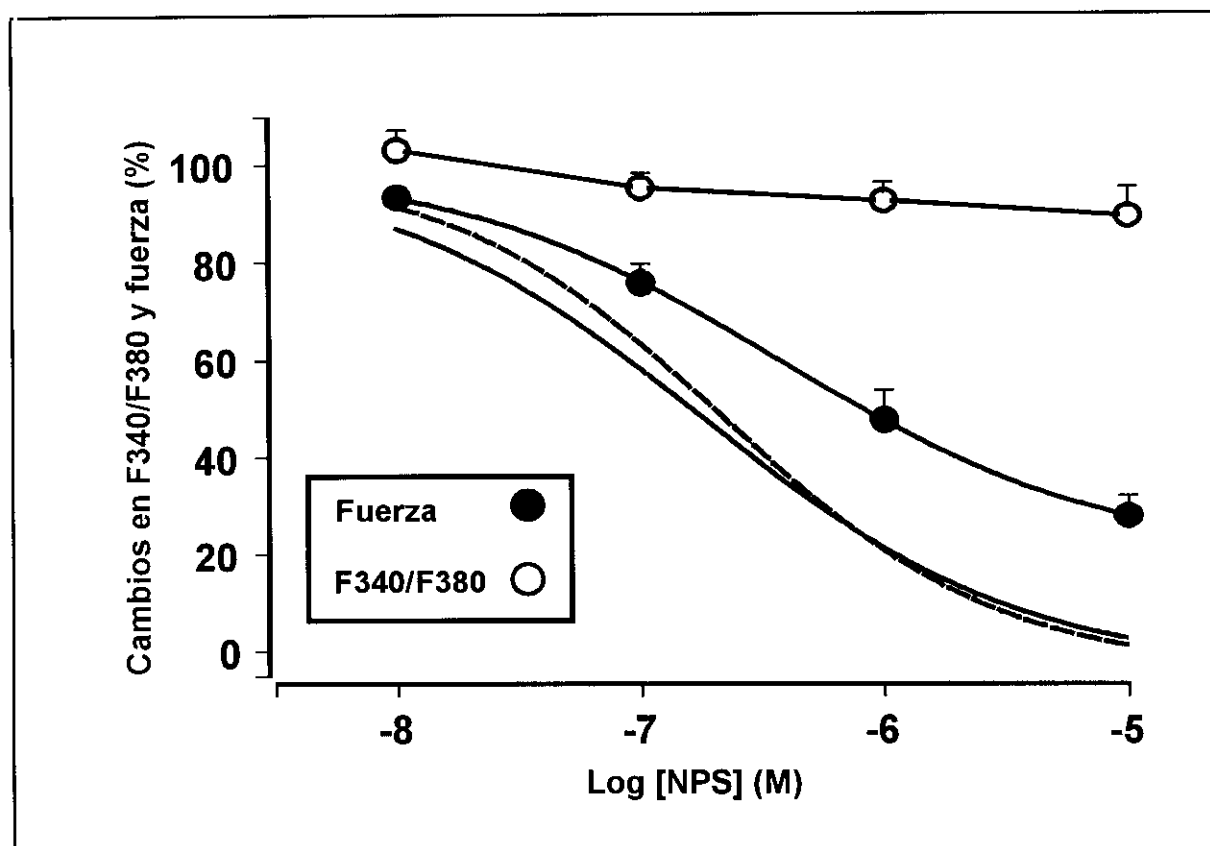
*Papel de la SERCA.* El tratamiento durante 40 minutos con tapsigargina ( $2 \times 10^{-6}$  M), un inhibidor de la SERCA, produjo una respuesta contráctil de  $391 \pm 90$  mg ( $n = 11$ ) y  $56 \pm 29$  mg ( $n = 7$ ) en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente. La tapsigargina no modificó la vasoconstricción inducida por NA, pero desplazó marcadamente a la derecha la curva de relajación a NPS tanto en arterias pulmonares ( $\text{pD}_2 = 5.69 \pm 0.19$ , Fig 17) como

en las mesentéricas ( $pD_2 = 5.89 \pm 0.19$ , Fig 18) y redujo el  $E_{max}$  en las primeras ( $71 \pm 7 \%$ ). De este modo, la activación de la SERCA parece mediar gran parte del efecto vasodilatador del NPS en arterias pulmonares y mesentéricas.

En experimentos realizados con arterias pulmonares en el baño de órganos acoplado al fluorímetro, la exposición a tapsigargina durante 10 minutos incrementó el cociente F340/F380 sobre la basal ( $60 \pm 6\%$  de la respuesta inducida por 80 mM de KCl,  $n = 5$ ; Fig 19). Sin embargo, este aumento en el cociente F340/F380 no se acompañó de cambios en la respuesta contráctil (Fig 19). La posterior adición de NA ( $10^{-5}M$ ) aumentó aún más el cociente F340/F380 hasta alcanzar el  $131 \pm 18\%$  de la respuesta a 80 mM de KCl ( $P < 0.05$ , con respecto a anillos en ausencia de tapsigargina) y produjo una respuesta contráctil ( $90 \pm 16\%$  de la respuesta a 80 mM de KCl). Así, la relación fuerza-F340/F380 para la NA fue significativamente inferior en arterias tratadas con tapsigargina ( $0.72 \pm 0.11$ ) que en aquéllas no tratadas. El curso temporal del aumento en el cociente F340/F380 y fuerza contráctil inducido por NA fue similar en ausencia y presencia de tapsigargina (Figs 11 y 19). Sin embargo, la tapsigargina inhibió muy marcadamente la reducción en el cociente F340/F380 inducida por NPS, mientras que sólo de forma parcial la relajación inducida por este dador de NO (Figs 19 y 20).



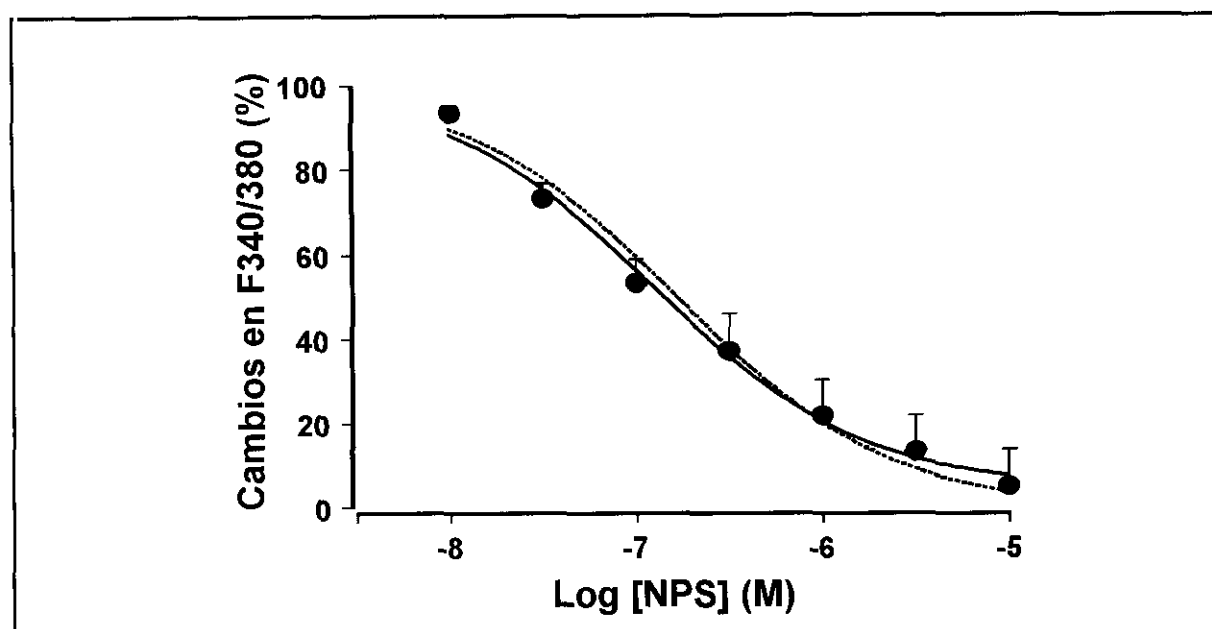
**Figura 19.** Registro simultáneo de los cambios en la fuerza contráctil y en la  $[Ca^{2+}]_i$  expresada como el cociente F340/F380 inducidos por el NPS en una arteria pulmonar tratada con tapsigargina ( $2 \times 10^{-6}M$ ) y, posteriormente, estimulada con NA ( $10^{-5}M$ ).



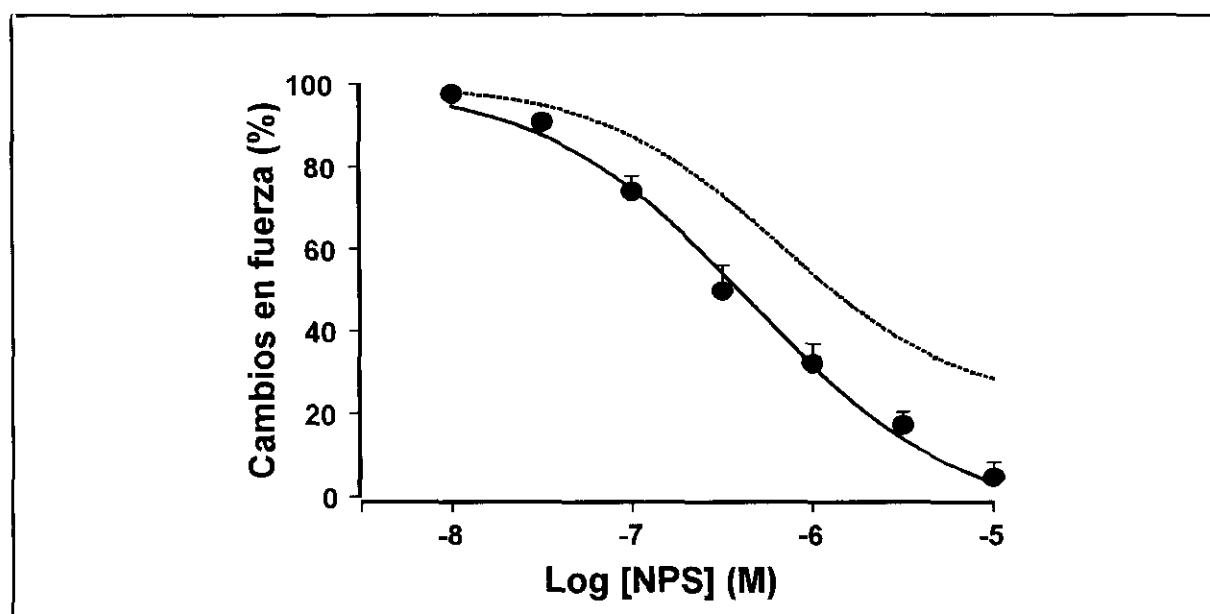
**Figura 20.** Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (F340/F380) y fuerza contráctil inducidos por el NPS en arterias contraídas con NA en ausencia (sin símbolos) o presencia de taspigargina (círculos), expresados como porcentaje de la máxima respuesta del agente vasoconstrictor. Las curvas en ausencia de tratamiento proceden de la Fig 12 y se muestran con fines comparativos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).

#### IV.IV. Mecanismo de la interacción de U46619 con la vía NO/GMPc en arterias pulmonares.

Las Figs 21 y 22 muestran las respuestas a NPS en arterias pretratadas con la estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) durante 20-30 minutos antes de su exposición a U46619 ( $3 \times 10^{-7}M$ ). La estaurosporina no alteró el cociente F340/F380 ni la fuerza contráctil basales, y tampoco modificó el aumento en F340/F380 y fuerza inducidos por U46619 ( $81 \pm 16\%$  y  $190 \pm 34\%$  de la respuesta inicial a 80 mM de KCl, respectivamente, n = 6). Sin embargo, el cociente fuerza-F340/F380 fue significativamente mayor ( $2.62 \pm 0.27$ ) que la observada en ausencia de estaurosporina. La posterior adición de NPS de forma acumulativa produjo una reducción concentración dependiente del cociente F340/F380 que fue similar a la obtenida en ausencia de estaurosporina (Fig 21). Sin embargo, la presencia de estaurosporina aumentó de forma significativa ( $P < 0.05$ ) la respuesta vasodilatadora máxima inducida por NPS (Fig 22).



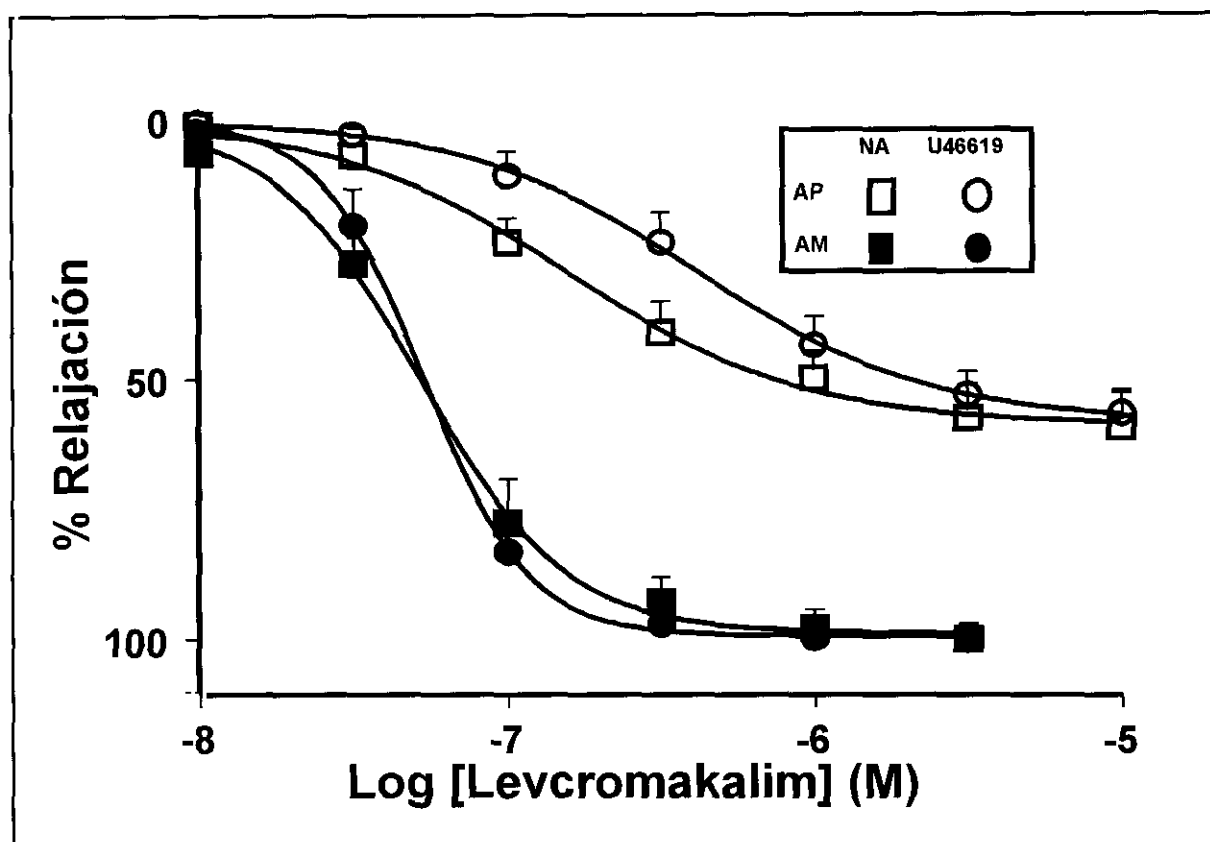
**Figura 21.** Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (F340/F380) inducidos por el NPS en arterias pulmonares contraídas con U46619 en ausencia (línea discontinua) o presencia de estaurosporina (círculos), expresados como porcentaje de la máxima respuesta del agente vasoconstrictor. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).



**Figura 22.** Cambios en la fuerza contráctil inducidos por el NPS en arterias pulmonares contraídas con U46619 en ausencia (línea discontinua) o presencia de estaurosporina (círculos), expresados como porcentaje de la máxima respuesta del agente vasoconstrictor. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).

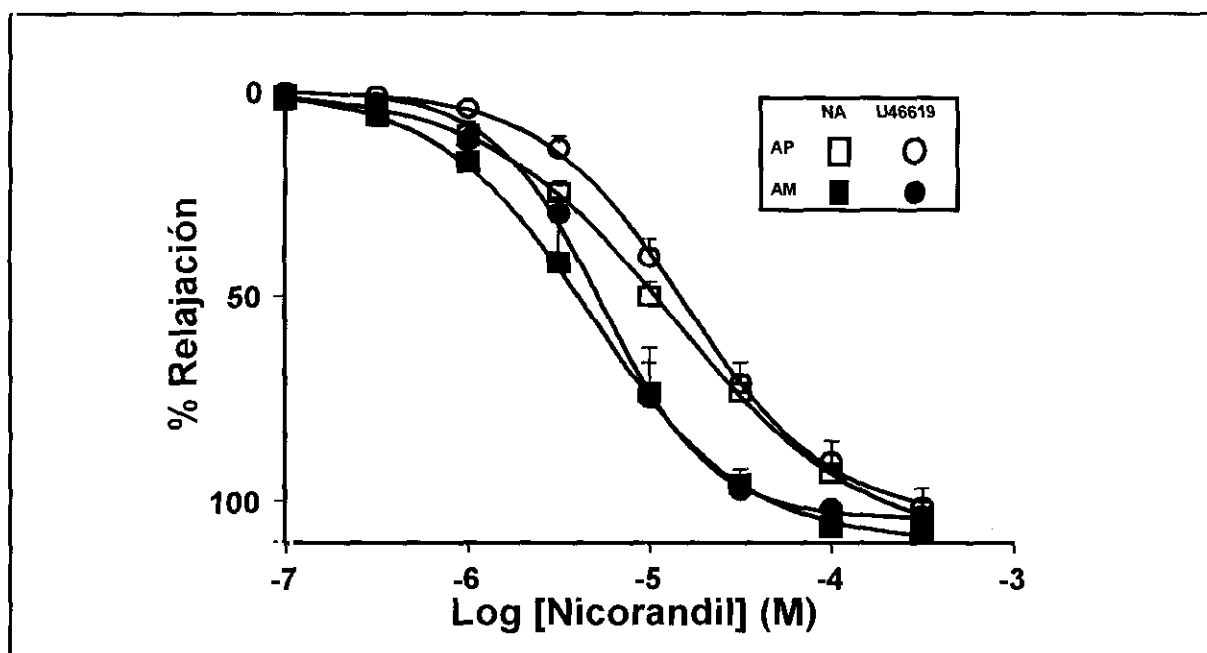
#### IV.V. Vasodilatación inducida por levcromakalim, nicorandil y verapamil en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón contraídas con NA y U46619.

El levcromakalim ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) produjo una relajación parcial de las arterias pulmonares, mientras que relajó completamente las arterias mesentéricas independientemente del agente vasoconstrictor empleado (Fig 23).

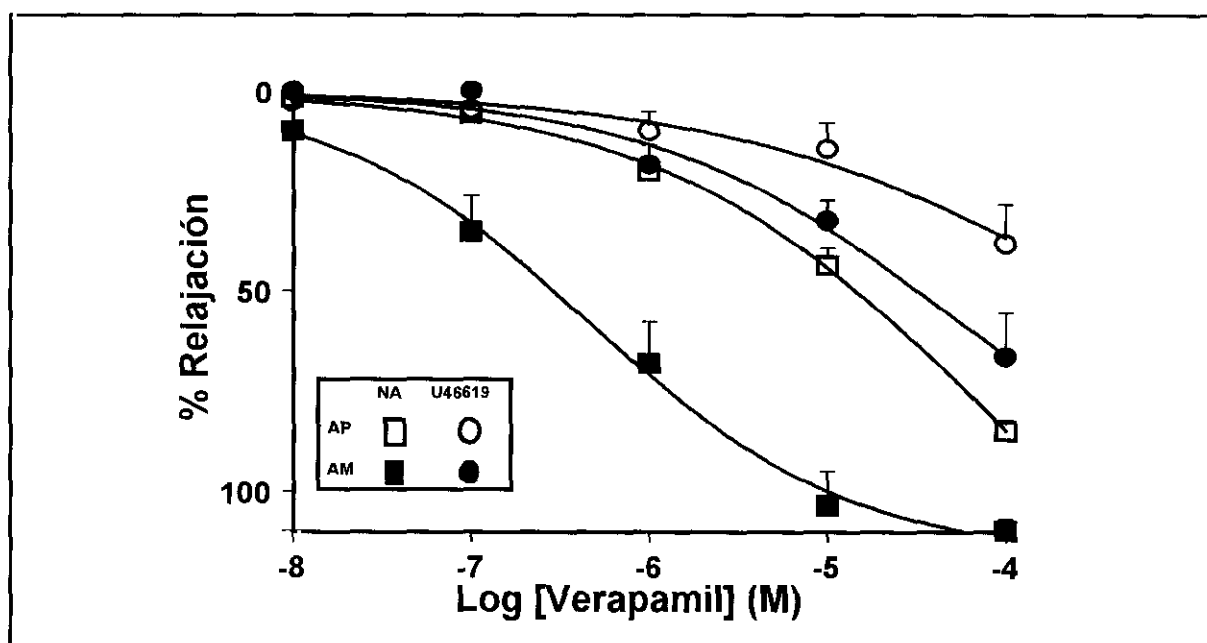


**Figura 23.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el levcromakalim en arterias pulmonares (AP) y mesentéricas (AM) contraídas con NA y U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-6).

El nicorandil ( $10^{-7}$ - $3 \times 10^{-4}$  M), un agente que se comporta como ACP y dador de NO, relajó completamente arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con NA o U46619 (Fig 24). Los valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  de relajación de levcromakalim y nicorandil se encuentran en la Tabla 3. Como se muestra en esta Tabla, las arterias pulmonares contraídas con U46619, que eran relajadas sólo parcialmente por NPS y levcromakalim, fueron totalmente relajadas por el nicorandil, un agente que comparte ambos mecanismos de acción.



**Figura 24.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias pulmonares (AP) y mesentéricas (AM) contraídas con NA y U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 6-7).



**Figura 25.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el verapamil en arterias pulmonares (AP) y mesentéricas (AM) contraídas con NA y U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 4-7)

La respuesta vasodilatadora del verapamil ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M) fue dependiente tanto del tipo de arteria como del agente vasoconstrictor. Las contracciones inducidas por la NA en arterias mesentéricas fueron más sensibles que aquéllas inducidas en arterias pulmonares o por U46619 en ambas arterias (Fig 25). Los parámetros de la mayoría de las curvas concentración-respuesta a verapamil no pudieron ser calculados ya que a la máxima concentración utilizada, el fármaco no alcanzó su máxima respuesta vasodilatadora.

#### IV.VI. Efectos de ODQ, glibenclamida o de ambos fármacos sobre la relajación inducida por NPS, levromakalim y nicorandil.

En arterias pulmonares contraídas con NA, el ODQ inhibió marcadamente la relajación a NPS (Fig 26) pero no afectó a la vasodilatación inducida por levromakalim (Fig 27), mientras que la glibenclamida, un inhibidor de canales  $K_{ATP}$ , no modificó la respuesta vasodilatadora al NPS (Fig 26), pero inhibió marcadamente la vasodilatación inducida por levromakalim (Fig 27).

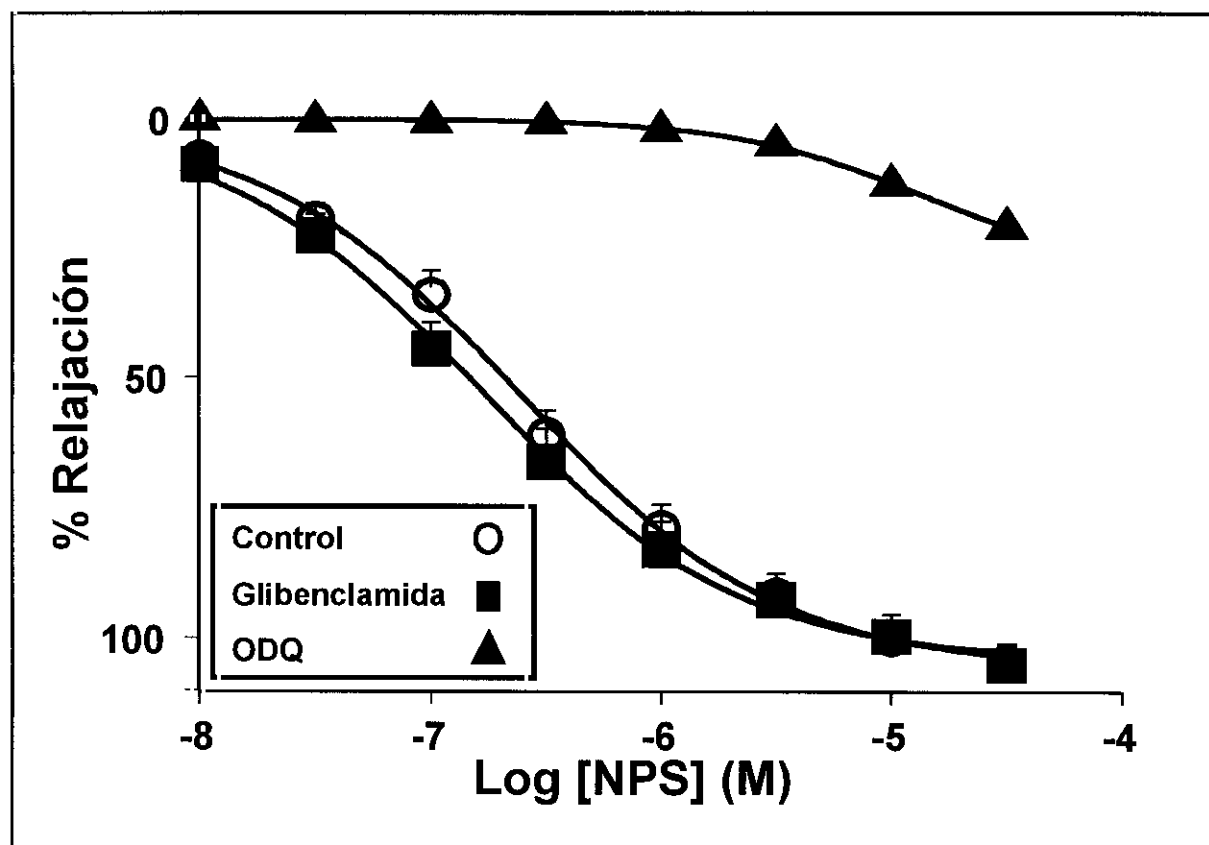
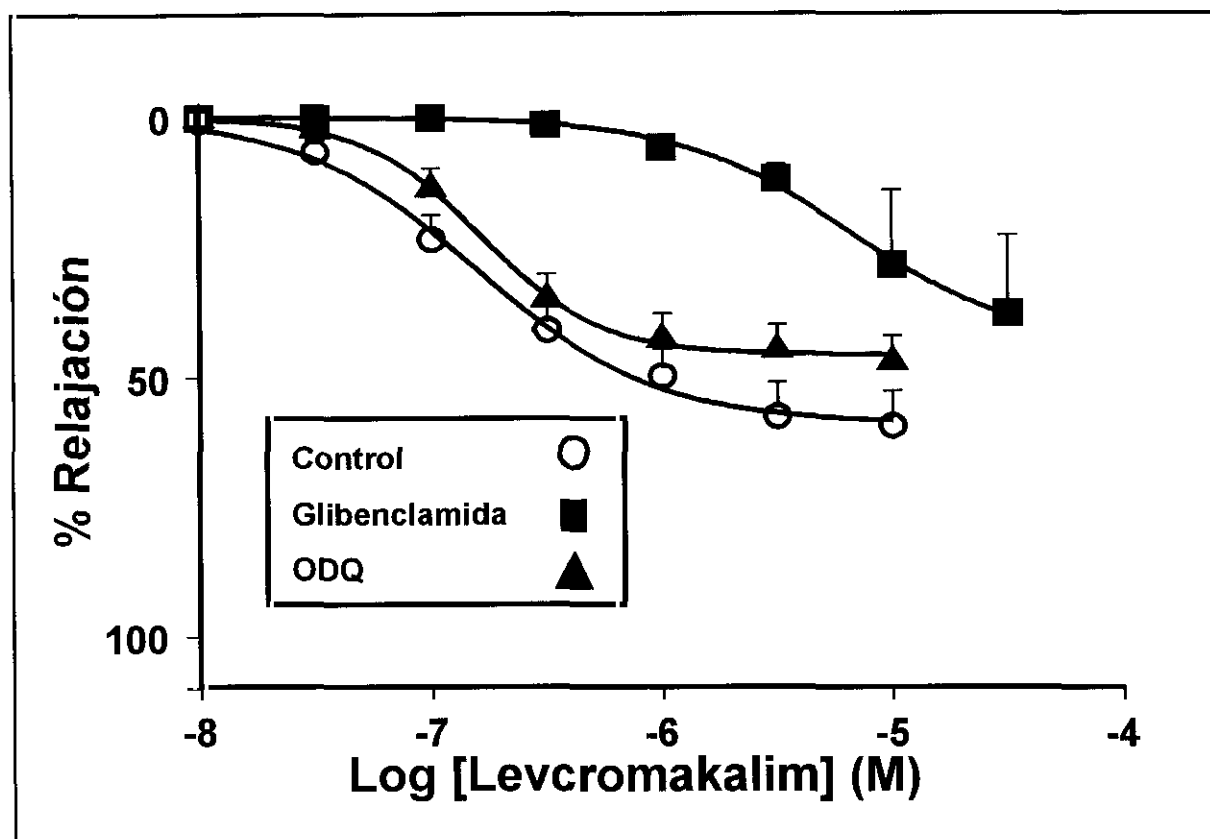
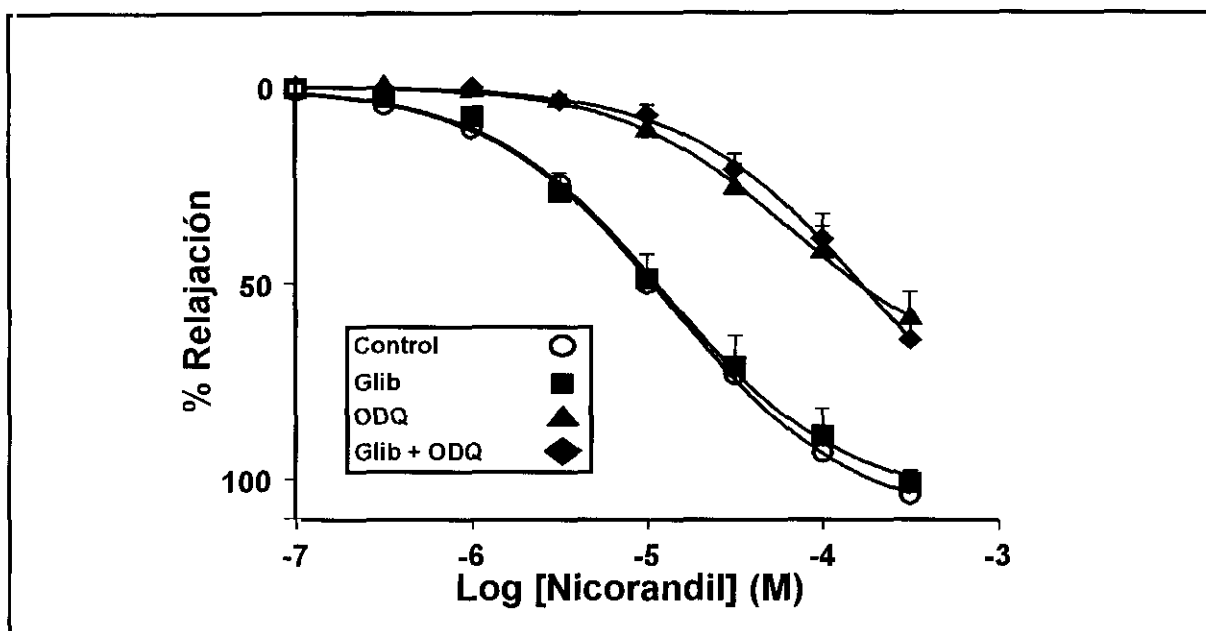


Figura 26. Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en arterias pulmonares contraídas con NA en ausencia (control) o presencia de ODQ o de glibenclamida. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 6-25).

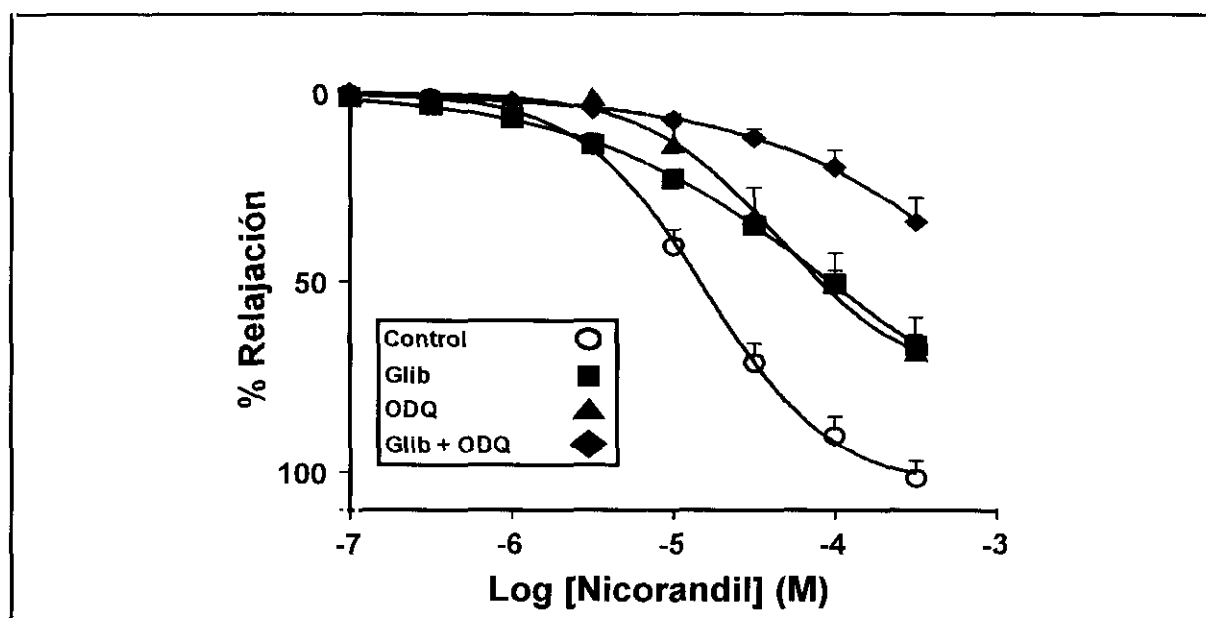


**Figura 27.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el levromakalim en arterias pulmonares contraídas con NA en ausencia (control) o presencia de ODQ o de glibenclamida. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-7).

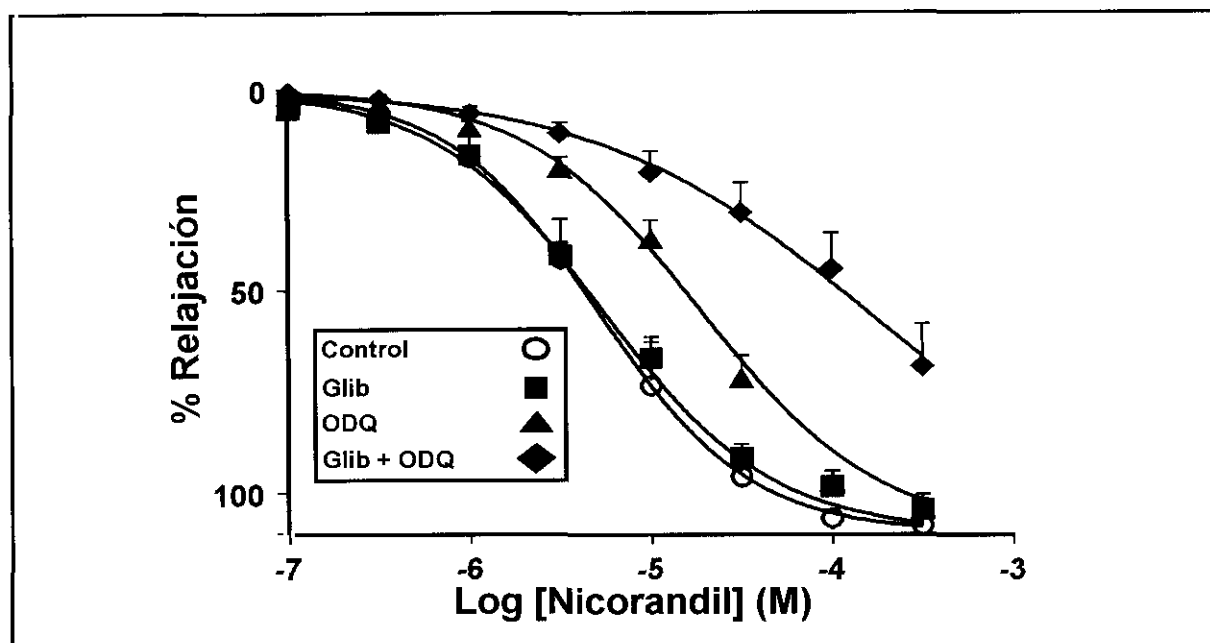
Las Figs 28-31 muestran la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con NA o U46619 y en ausencia o presencia de ODQ, glibenclamida o ambos. La respuesta vasodilatadora a nicorandil fue inhibida por el ODQ (Log CR = 1.25), mientras que no se afectó por la presencia de glibenclamida (Log CR = -0.05) en arterias pulmonares contraídas con NA; además, el tratamiento con ODQ más glibenclamida no modificó la inhibición inducida por ODQ sólo (log CR para ODQ + glibenclamida = 1.2) (Fig 28). En arterias pulmonares (Fig 29) y mesentéricas (Fig 31) contraídas con U46619 tanto el ODQ (Log CR = 0.85 y 1.04 para arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente) como la glibenclamida (Log CR = 0.83 y 0.51 para arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente) desplazaron a la derecha la relajación inducida por el nicorandil, mientras que la asociación de ambos inhibidores produjo un desplazamiento superior al inducido por cada uno en solitario (Log CR para ODQ + glibenclamida = 1.51 y 1.54 en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente). En arterias mesentéricas contraídas con NA (Fig 30), el ODQ inhibió la relajación producida por el nicorandil (log CR = 0.58). En estas arterias, la glibenclamida no modificó la relajación inducida por el nicorandil (log CR = 0.07); sin embargo, en presencia del ODQ, desplazó marcadamente a la derecha la curva de relajación (log CR para ODQ + glibenclamida = 1.37).



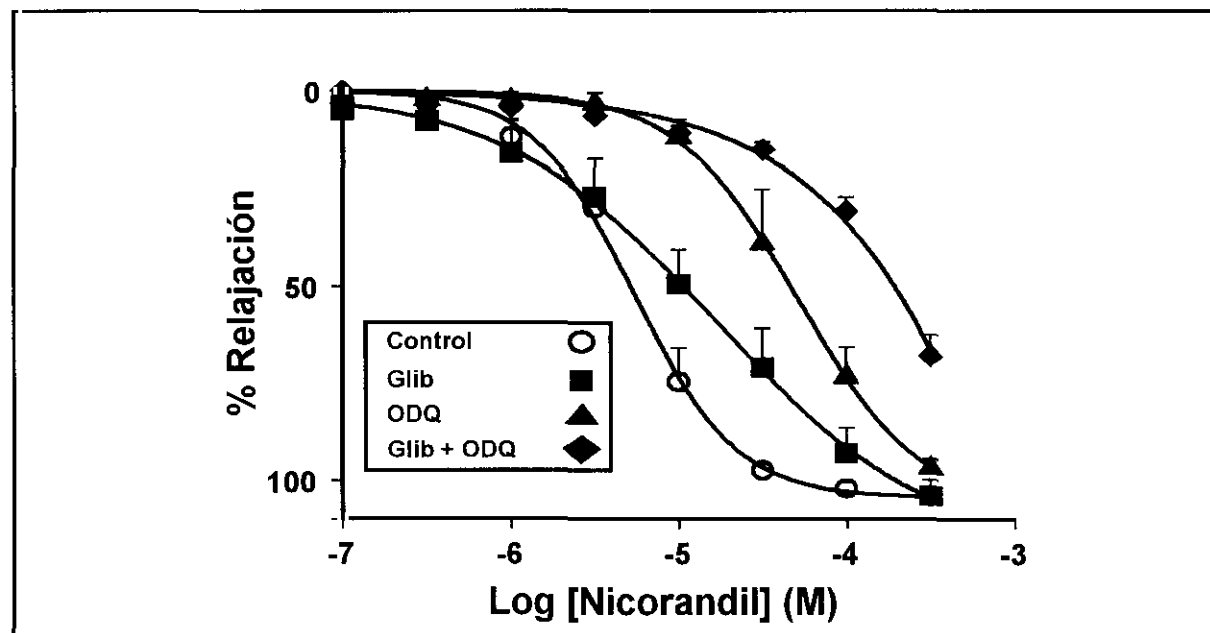
**Figura 28.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias pulmonares contraídas con NA en ausencia (control) o en presencia de ODQ, de glibenclamida (Glib) o de ambos (Glib + ODQ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-9).



**Figura 29.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias pulmonares contraídas con U46619 en ausencia (control) o en presencia de ODQ, glibenclamida (Glib) o de ambos (Glib + ODQ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 6-8).



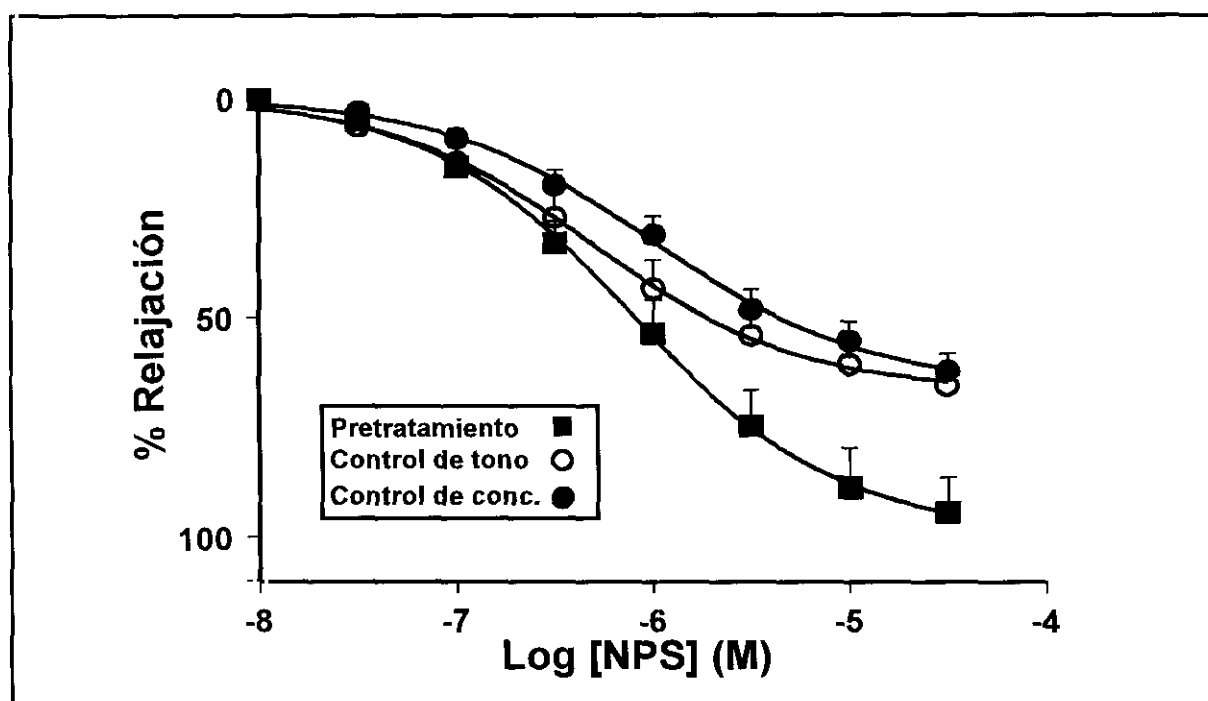
**Figura 30.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias mesentéricas contraídas con NA en ausencia (control) o en presencia de ODQ, de glibenclamida (Glib) o de ambos (Glib + ODQ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-8).



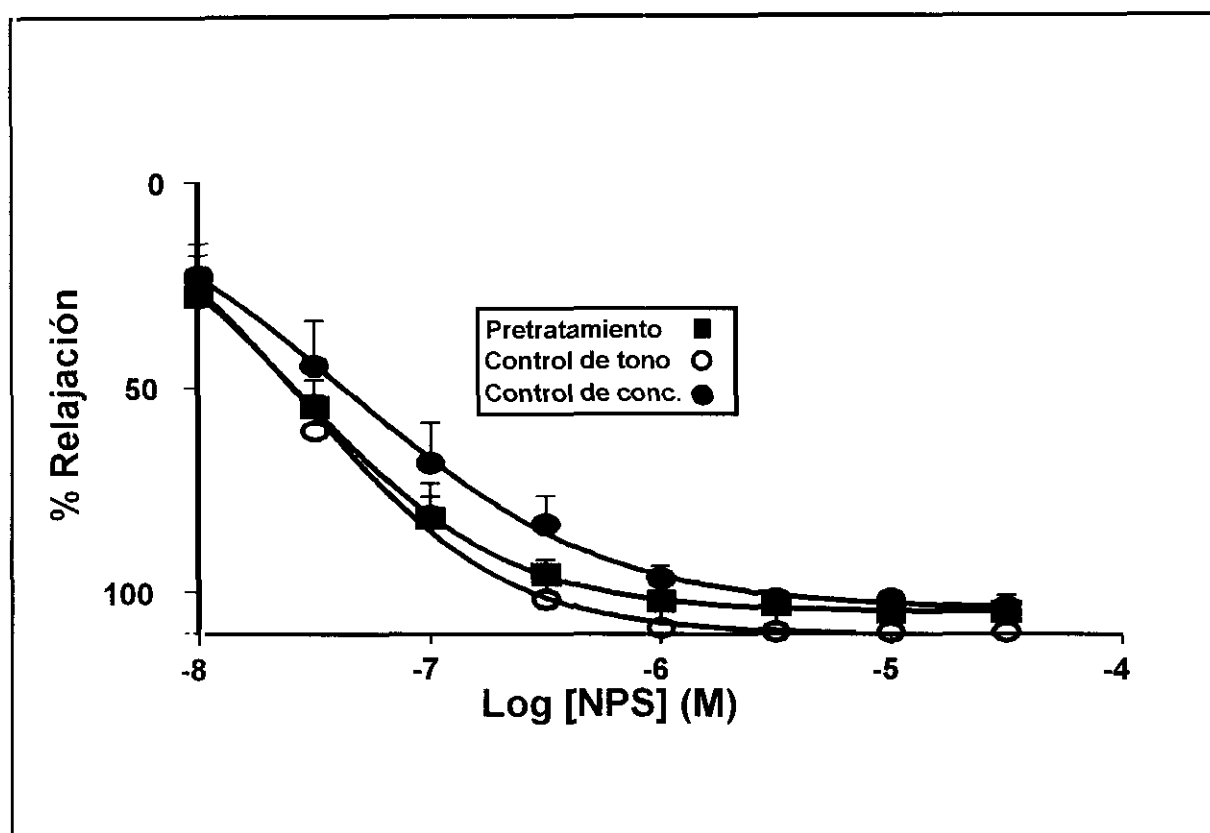
**Figura 31.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el nicorandil en arterias mesentéricas contraídas con U46619 en ausencia (control) o en presencia de ODQ, de glibenclamida (Glib) o de ambos (Glib + ODQ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 4-6).

#### IV.VII. Efectos de la combinación de NPS y levromakalim.

*Relajación de cada fármaco en presencia de una concentración única del otro.* En estos experimentos se estudió la vasodilatación inducida por el NPS en presencia de una concentración de levromakalim y viceversa, en arterias mesentéricas contraídas con NA ( $3 \times 10^{-6}M$ ) y en arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $10^{-6}M$ ). Estos resultados se han comparado con controles de concentración y de tono (ver material y métodos, apartado III.IV.8). El tratamiento con una concentración de levromakalim de  $3 \times 10^{-7}M$  en arterias pulmonares y de  $3, 5$  ó  $7 \times 10^{-8}M$  en arterias mesentéricas, produjo una relajación de  $34 \pm 5\%$  y de  $23 \pm 2\%$ , respectivamente. En arterias pulmonares contraídas con U46619, el pretratamiento con levromakalim permitió aumentar el efecto máximo vasodilatador del NPS ( $E_{max} = 101 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ) con respecto a controles de concentración ( $E_{max} = 66 \pm 7\%$ ,  $n = 12$ ) y de tono ( $E_{max} = 67 \pm 4\%$ ,  $n = 14$ ) (Fig 32), pero no modificó la potencia vasodilatadora del NPS ( $pD_2 = 6.0 \pm 0.1$ ) con respecto a arterias en ausencia de levromakalim ( $pD_2 = 5.9 \pm 0.1$  y  $6.2 \pm 0.1$  para controles de concentración y de tono, respectivamente). La relajación inducida por el NPS en arterias mesentéricas contraídas con NA no fue modificada por la presencia de levromakalim (Fig 33).

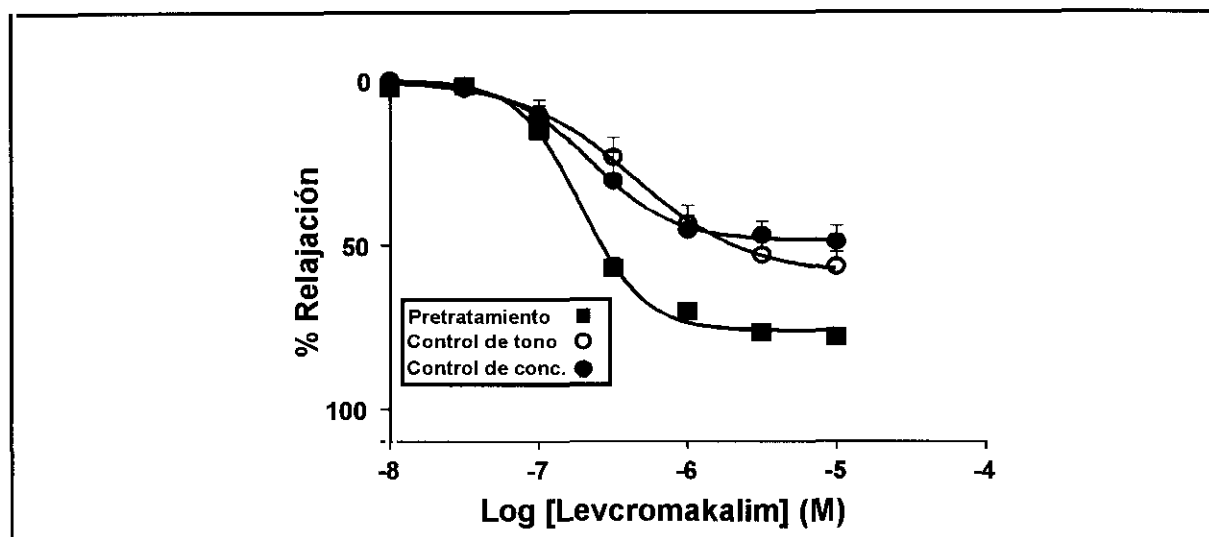


**Figura 32.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en ausencia y presencia del pretratamiento con levromakalim ( $3 \times 10^{-7}M$ ) en arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $10^{-6}M$ ). Se muestran dos tipos de controles: arterias contraídas con la misma concentración del U46619 que en presencia de pretratamiento (control de concentración), y arterias contraídas con una concentración de U46619 ( $10^{-7}M$ ) que produjo una contracción similar al tono final inducido por U46619 más pretratamiento (control de tono). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 6-14$ ).

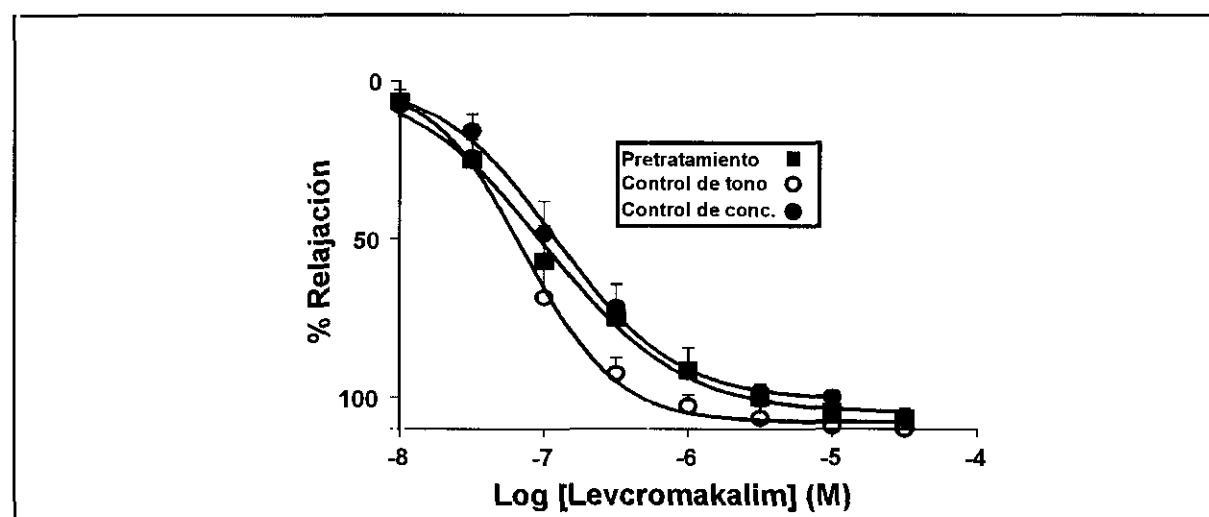


**Figura 33.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS en ausencia y presencia del pretratamiento con levcromakalim ( $3 \times 10^{-7}$  M) en arterias mesentéricas contraídas con NA ( $3 \times 10^{-6}$  M). Se muestran dos tipos de controles: arterias contraídas con la misma concentración de la NA que en presencia de pretratamiento (control de concentración) y arterias contraídas con una concentración de NA ( $10^{-6}$  M) que produjo una contracción similar al tono final inducido por NA más pretratamiento (control de tono). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-8$ ).

En otra serie de experimentos, la adición de una concentración de NPS de  $3 \times 10^{-7}$  M en arterias pulmonares y de  $3 \times 10^{-8}$  M en arterias mesentéricas produjo una relajación de  $34 \pm 4$  % y de  $20 \pm 4$  %, respectivamente. El pretratamiento con NPS mejoró la máxima respuesta vasodilatadora inducida por levcromakalim en arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $E_{\max} = 77 \pm 3$  %,  $n = 4$ ) con respecto a controles de concentración ( $E_{\max} = 47 \pm 4$  %,  $n = 5$ ) y de tono ( $E_{\max} = 57 \pm 5$  %,  $n = 6$ ), respectivamente (Fig 34). Sin embargo, los valores de  $pD_2$  del levcromakalim ( $6.7 \pm 0.1$ ) no fueron significativamente distintos que los obtenidos en ausencia de NPS ( $6.7 \pm 0.1$  y  $6.5 \pm 0.1$  control de concentración y de tono, respectivamente). En arterias mesentéricas contraídas con NA, el pretratamiento con NPS no modificó la respuesta vasodilatadora inducida por levcromakalim (Fig 35).

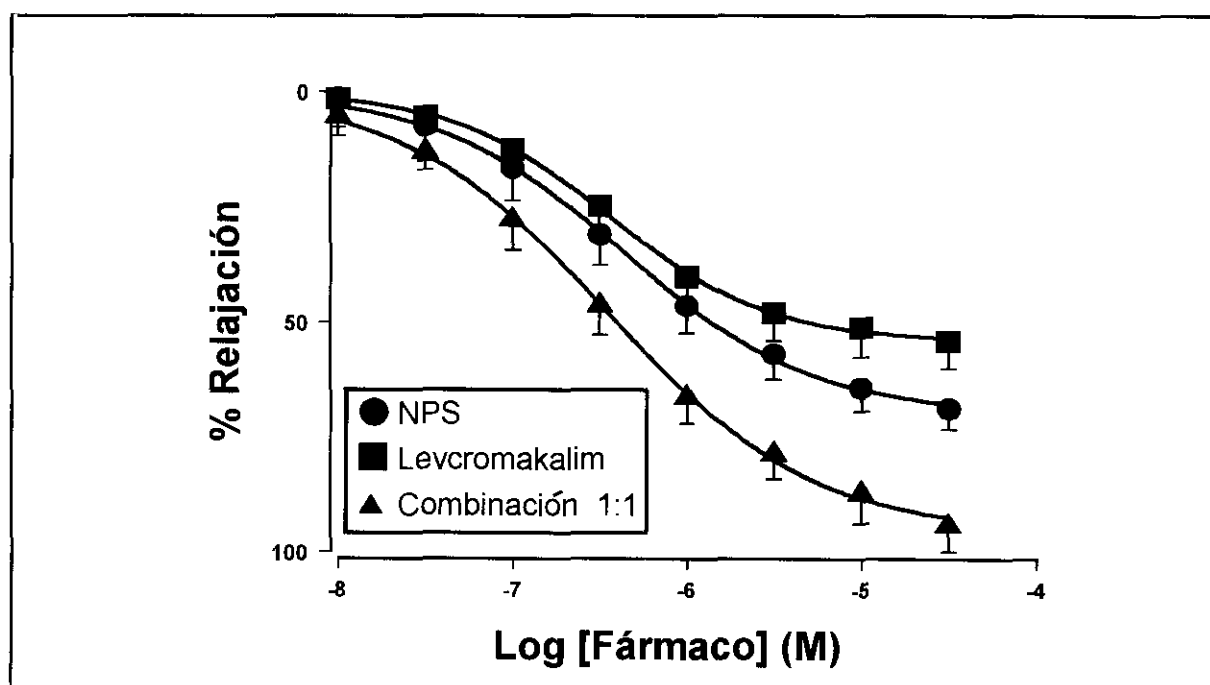


**Figura 34.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el levromakalim en ausencia y presencia del pretratamiento con NPS ( $3 \times 10^{-7}$  M) en arterias pulmonares contraídas con U46619 ( $10^{-6}$  M). Se muestran dos tipos de controles: arterias contraídas con la misma concentración del U46619 que en presencia de pretratamiento (control de concentración), y arterias contraídas con una concentración de U46619 ( $10^{-7}$  M) que produjo una contracción similar al tono final inducido por U46619 más pretratamiento (control de tono). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 4-6$ ).

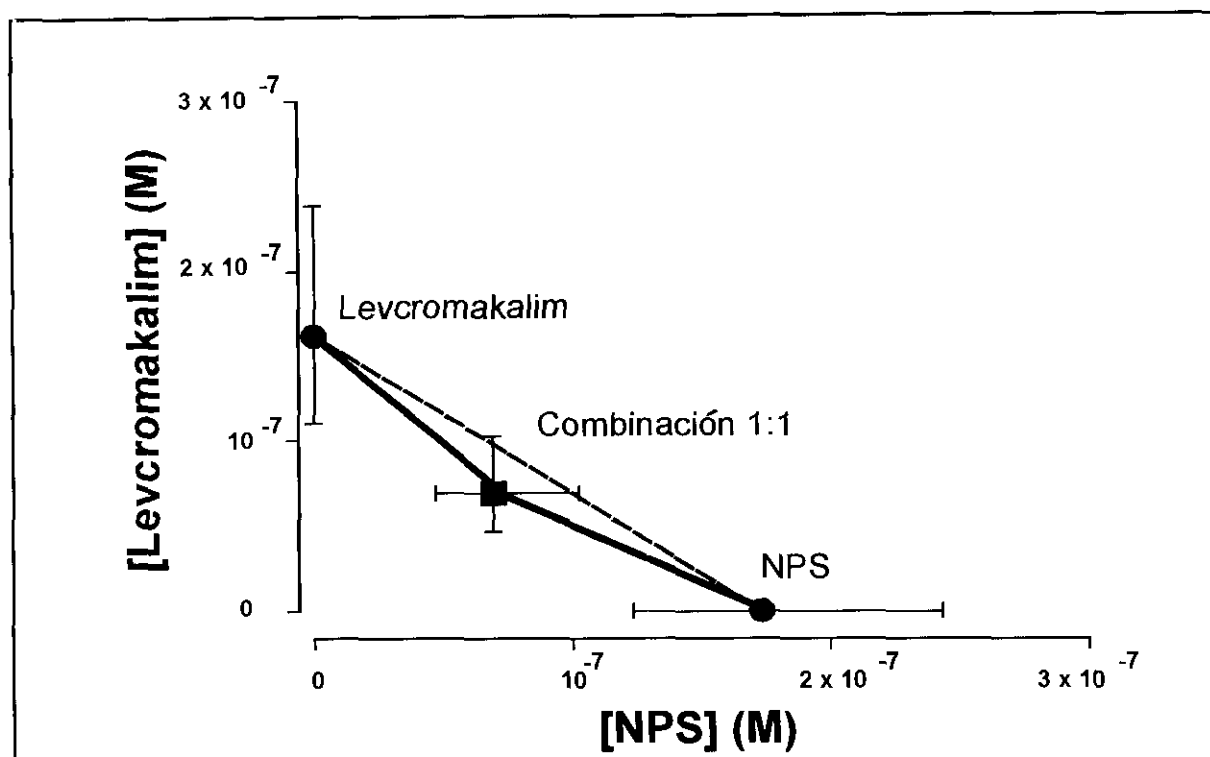


**Figura 35.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el levromakalim en ausencia y presencia del pretratamiento con NPS ( $3 \times 10^{-8}$  M) en arterias mesentéricas contraídas con NA ( $3 \times 10^{-6}$  M). Se muestran dos tipos de controles: arterias contraídas con la misma concentración de la NA que en presencia de pretratamiento (control de concentración), y arterias contraídas con una concentración de NA ( $10^{-6}$  M) que produjo una contracción similar al tono final inducido por NA más pretratamiento (control de tono). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-8$ ).

*Relajación inducida por la combinación de NPS y levromakalim (1:1) y análisis isobolográfico.* La Fig 36 muestra la relajación inducida por el NPS, el levromakalim y la combinación de ambos fármacos (1:1) en arterias pulmonares contraídas con U46619. A pesar de que el NPS y el levromakalim sólo relajaron parcialmente las arterias estimuladas con U46619, su combinación (1:1) las relajó de forma completa y con una potencia similar a la de cada fármaco solo ( $pD_2 = 6.44 \pm 0.11$ ,  $p > 0.05$  con respecto a NPS o levromakalim). El análisis isobolográfico (Fig 37) se llevó a cabo a partir de las curvas de relajación de NPS, levromakalim y su combinación (1:1) que aparecen en la Fig 36. En este análisis se representa la isobola obtenida a partir de las concentraciones de cada fármaco y de la combinación (1:1) que producían un 25 % del efecto máximo ( $EC_{25}$ ), ya que ni NPS ni levromakalim relajaron las arterias de forma completa. El punto de la combinación (1:1) no se alejó de la línea de aditividad, indicando la ausencia de interacciones entre ambos fármacos.



**Figura 36.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el NPS, levromakalim o su combinación (1:1) en arterias pulmonares contraídas con U46619. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 6-20$ ).



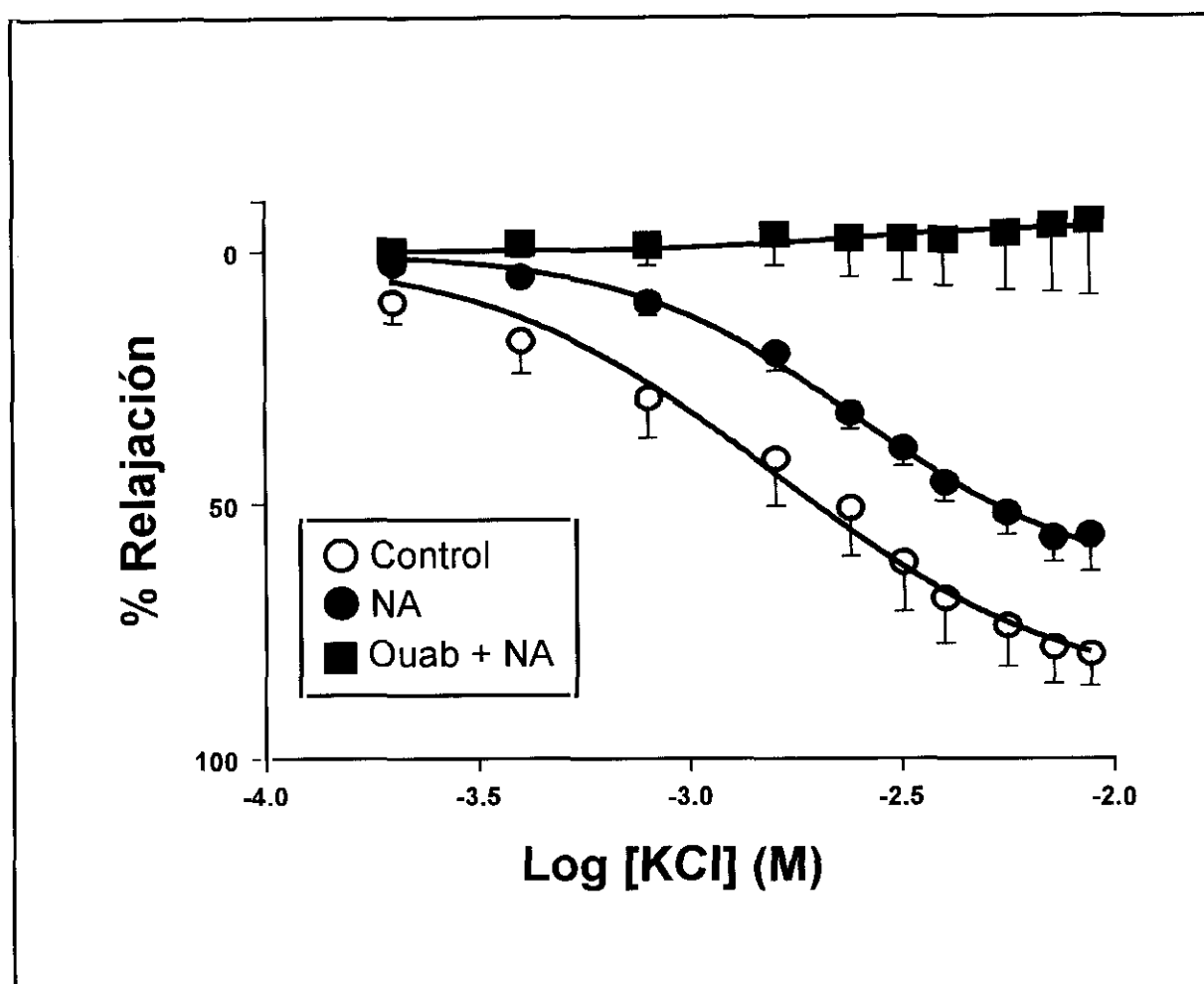
**Figura 37.** Isoblograma de la combinación de NPS y levromakalim. La línea negra representa la isobola obtenida a partir de las concentraciones de cada fármaco y de su combinación (1:1) que producían un 25% del efecto máximo ( $EC_{25}$ ) y la línea discontinua representa la línea de aditividad. Los datos proceden de las curvas concentración-respuesta de la figura 36.

#### IV.VIII. Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en una solución $0K^+$ .

*Relajación inducida por el KCl en arterias incubadas en una solución  $0K^+$ .* La exposición a una solución  $0K^+$  durante 1 hora produjo una respuesta contráctil que tardó unos 20-30 minutos en comenzar a desarrollarse. En estas condiciones, la adición de KCl de forma acumulativa (0.2-8.8 mM) indujo una relajación concentración-dependiente de arterias pulmonares (Fig 38) y mesentéricas (Fig 39). La Tabla 4 contiene las respuestas contráctiles inducidas por la solución  $0K^+$  y los valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  de las curvas concentración-respuesta a KCl en arterias pulmonares y mesentéricas. La relajación inducida por KCl fue más potente en arterias mesentéricas que en las pulmonares ( $pD_2 = 3.35 \pm 0.07$  y  $2.75 \pm 0.11$ , respectivamente,  $p < 0.05$ )

El tratamiento con ouabaína ( $10^{-5}M$ ) inmediatamente después de la exposición a  $0K^+$  prácticamente eliminó la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas estimuladas con NA, mientras que el tratamiento con  $BaCl_2$  ( $2 \times 10^{-5}M$ ) no la

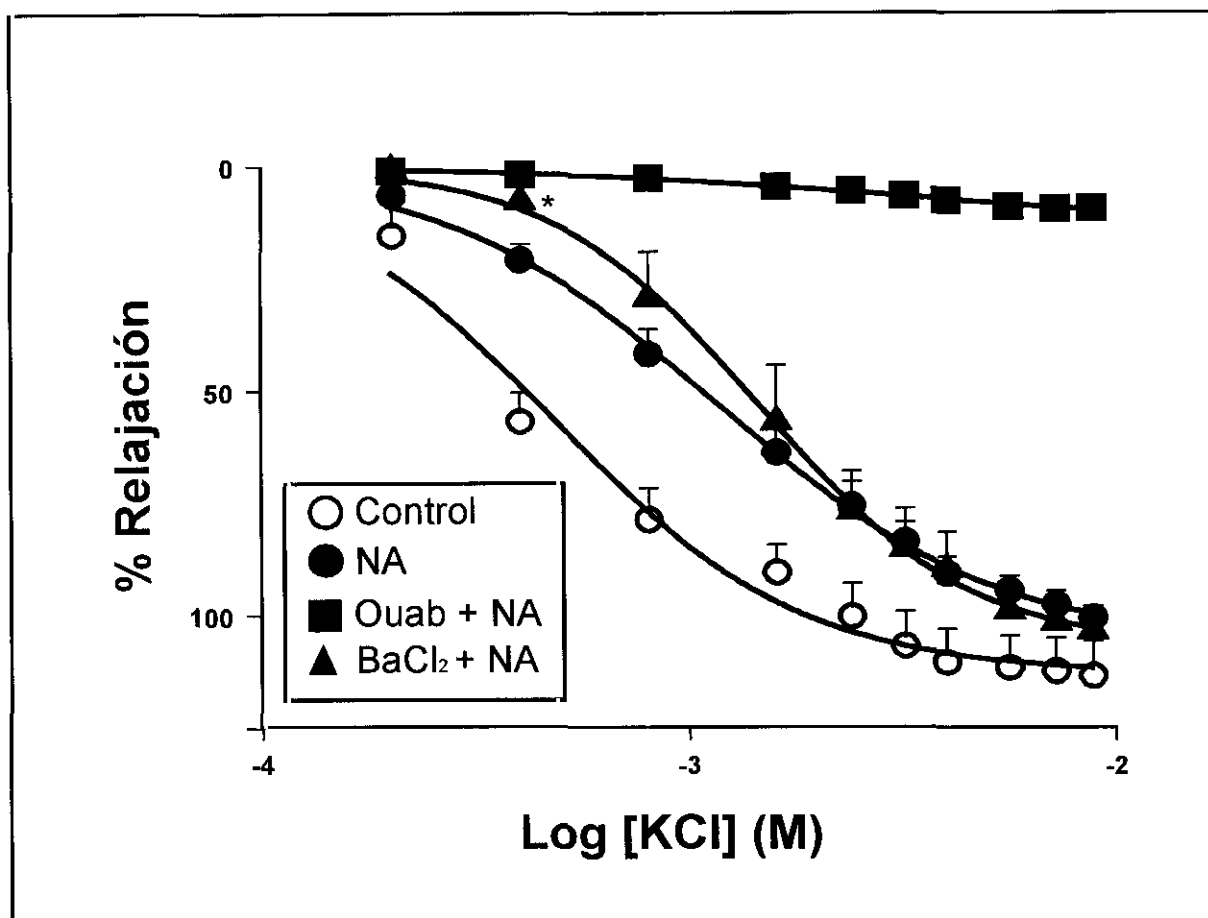
modificó (Figs 38 y 39). Estos resultados indicaban que la relajación inducida por el KCl estaba mediada a través de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y no a través de la activación de los canales  $\text{K}_{\text{IR}}$ .



**Figura 38.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0\text{K}^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control). Algunas arterias fueron tratadas con ouabaína (Ouab) inmediatamente después de la incubación con la solución  $0\text{K}^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-12$ ).

Algunos anillos fueron estimulados con NA, U46619 o ET-1 tras la exposición durante 1 hora a la solución  $0\text{K}^+$ , lo que produjo una mayor contracción (Tabla 4). Cuando esta respuesta vasoconstrictora se estabilizó, la adición del KCl relajó totalmente las arterias mesentéricas independientemente del agonista empleado (Fig 41), mientras que sólo de forma parcial las arterias pulmonares contraídas con NA ( $E_{\text{max}} = 70 \pm 6$ ), ET-1 ( $E_{\text{max}} = 62 \pm 4$ ) o U46619 ( $E_{\text{max}} = 73 \pm 7$ ) (Tabla 4 y Fig 40). La NA, el U46619 y la ET-1 desplazaron marcadamente

a la derecha la curva concentración-respuesta a KCl en arterias mesentéricas, mientras que no la modificaron en arterias pulmonares (Tabla 4 y Figs 40 y 41). Por lo tanto, los tres agentes inhibieron la relajación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas, salvo en el caso de las arterias pulmonares tratadas con U46619. Sin embargo, el tipo de inhibición fue distinta dependiendo del vaso arterial; en arterias pulmonares estos agentes inhibieron el efecto máximo, mientras que en las mesentéricas redujeron la potencia vasodilatadora del KCl.

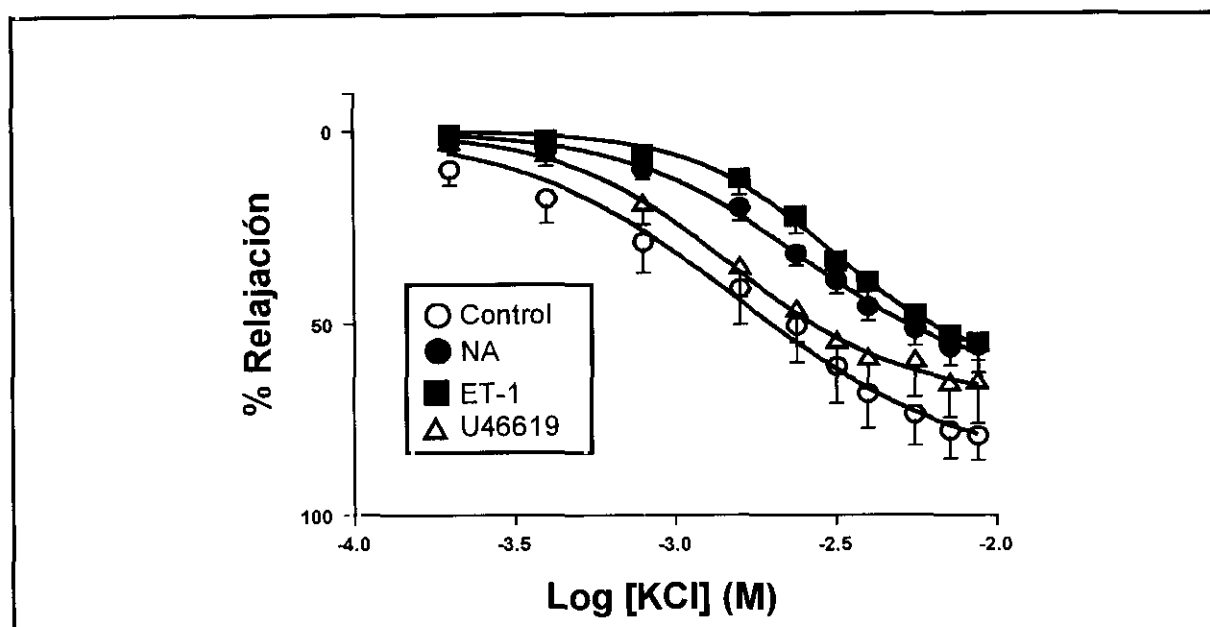


**Figura 39.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control). Algunas arterias fueron tratadas con ouabaína (Ouab) o  $BaCl_2$  inmediatamente después de la incubación con la solución  $0K^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-15$ ). \*  $p < 0.05$  con respecto a arterias estimuladas con NA.

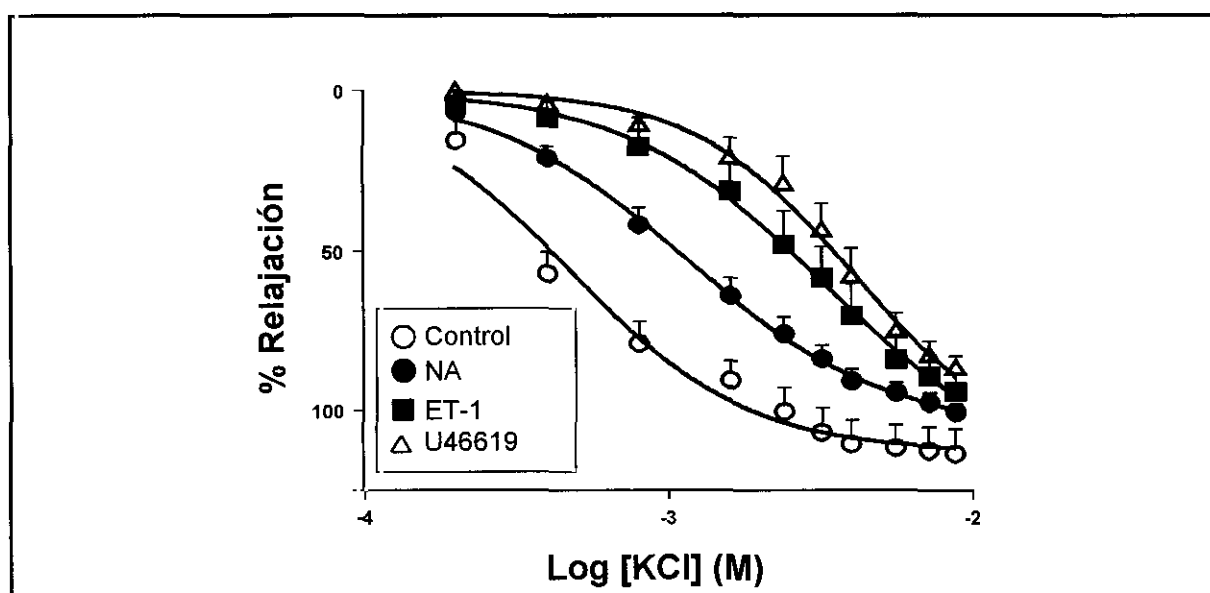
**Tabla 4.** Resumen de la relajación inducida por el KCl en arterias pulmonares y mesentéricas bajo diversas condiciones experimentales. Las arterias fueron tratadas con una solución  $0K^+$  durante 80 minutos. NA, U46619 y ET-1 fueron añadidas a los 60 minutos de la exposición a  $0K^+$ , el resto de los fármacos lo fue inmediatamente después de la exposición a  $0K^+$ .

Tratamiento	Arterias pulmonares				Arterias mesentéricas			
	n	Tono	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	n	Tono	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>
Control	7	630 ± 169	2.75 ± 0.11	93 ± 6	5	1313 ± 293	3.35 ± 0.07	110 ± 9
PMA	5	725 ± 79	2.59 ± 0.13	21 ± 3 **	9	3222 ± 529 **	3.37 ± 0.1	76 ± 7 **
NA	12	937 ± 127	2.58 ± 0.06	70 ± 6 *	15	2604 ± 365 *	2.95 ± 0.07 **	105 ± 3
NA + PMA	8	848 ± 163	2.51 ± 0.08	41 ± 8 #	6	3276 ± 449	3.01 ± 0.12	66 ± 9 ##
NA + Quin	12	662 ± 100	3.01 ± 0.11 ##	68 ± 13	5	1720 ± 441	2.95 ± 0.10	99 ± 5
NA + PMA + Quin	7	713 ± 85	2.59 ± 0.08	29 ± 6 \$	5	1216 ± 316 \$	2.99 ± 0.18	55 ± 17
NA + St	7	615 ± 112	2.49 ± 0.08	76 ± 8	7	1450 ± 272	3.12 ± 0.07 #	102 ± 3
NA + Prop	5	1342 ± 335	2.47 ± 0.04	68 ± 10	5	3145 ± 585	2.93 ± 0.09	105 ± 3
U46619	10	817 ± 99	2.76 ± 0.08	73 ± 7	12	2959 ± 517 **	2.47 ± 0.09 **	103 ± 7
U46619 + Quin	8	804 ± 142	2.97 ± 0.03 ++	56 ± 4 †	8	2070 ± 542	2.81 ± 0.08 +	105 ± 7
U46619 + St	7	615 ± 70	2.75 ± 0.08	93 ± 8	9	1927 ± 285	2.83 ± 0.12 +	105 ± 7
ET-1	9	930 ± 98	2.51 ± 0.06	62 ± 4 **	7	3110 ± 603 *	2.57 ± 0.11 **	109 ± 4
ET-1 + Quin	7	844 ± 137	2.87 ± 0.14 &	69 ± 7	6	2537 ± 554	2.68 ± 0.12	99 ± 5
ET-1 + St	7	637 ± 99 &&	2.7 ± 0.08	90 ± 5 &&	6	1975 ± 467	2.98 ± 0.14 &	113 ± 5

Tono es la respuesta contráctil (en mg) inducida por una solución  $0K^+$  en ausencia y presencia de diversos tratamientos antes de la adición de KCl. E<sub>max</sub> es la máxima respuesta vasodilatadora de KCl expresada como porcentaje del tono inicial y el pD<sub>2</sub> es la concentración de KCl (-log molar) que induce la mitad del máximo efecto vasodilatador. Los resultados se expresan como la media ± SEM. \* y \*\* P < 0.05 y P < 0.01 vs control, #, ## P < 0.05 y P < 0.01 vs NA, \$\$ P < 0.01 vs NA + PMA, † P < 0.05 vs U46619, & P < 0.01 vs ET-1. Abreviaturas: Quin (quinacrina), St (estaurosporina) y Prop (propranolol).

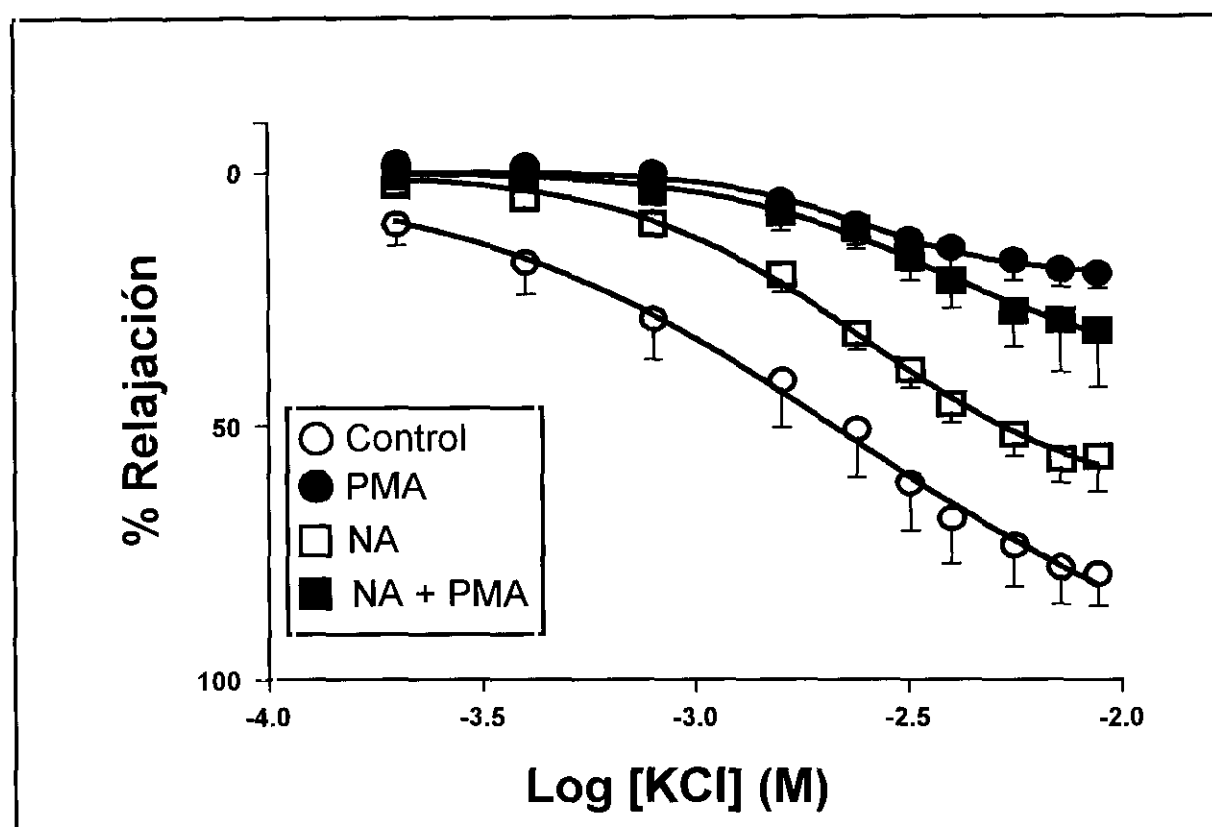


**Figura 40.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA, U46619, ET-1 o vehículo (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 7-12).

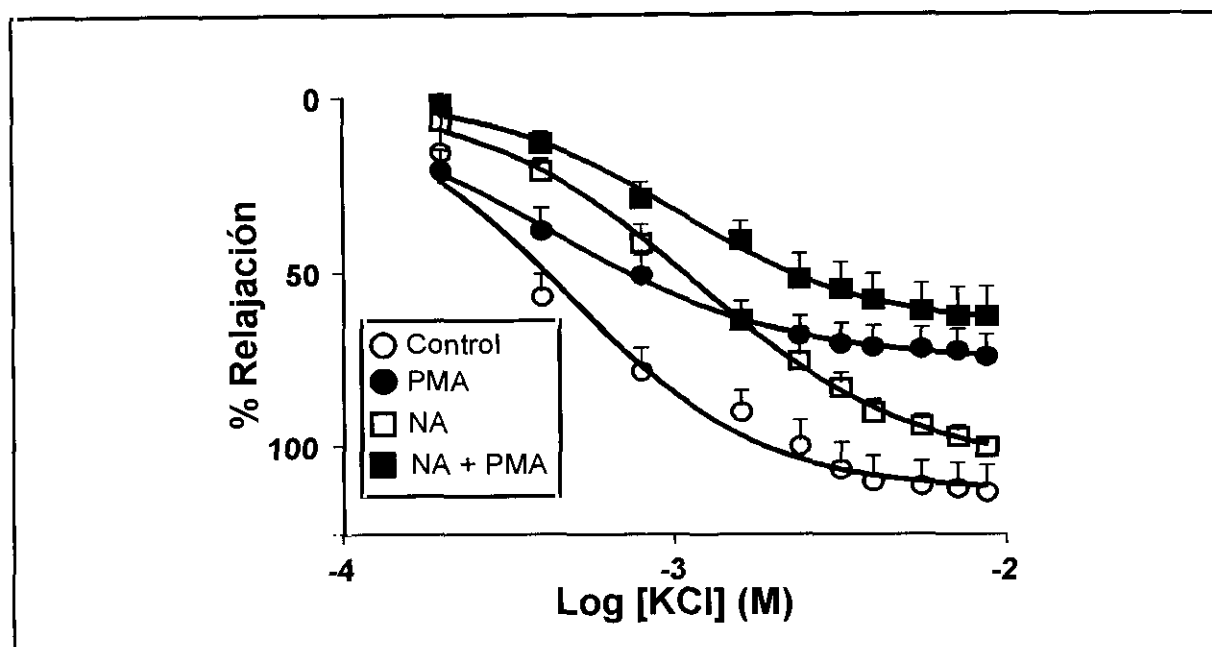


**Figura 41.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA, U46619, ET-1 o vehículo (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-15).

*Efectos de los ésteres de forbol.* La exposición simultánea a la solución  $0K^+$  y al PMA ( $10^{-7}M$ ) produjo una respuesta contráctil, que al cabo de 80 minutos alcanzaba una amplitud equivalente a la obtenida en arterias incubadas en la solución  $0K^+$  y tratadas con NA, U46619 o ET-1 (Tabla 4). El PMA redujo marcadamente el  $E_{max}$  del KCl, pero no modificó su potencia ( $pD_2$ ) tanto en arterias pulmonares como mesentéricas (Tabla 4 y Figs 42 y 43). Algunas arterias, fueron expuestas a la solución  $0K^+$  + PMA durante 1 hora y, posteriormente, estimuladas con NA, lo que indujo una respuesta contráctil similar a la obtenida en ausencia de PMA. En estas arterias, de nuevo la presencia de PMA no modificó los valores de  $pD_2$  del KCl pero inhibió la máxima respuesta vasodilatadora (Tabla 4 y Figs 42 y 43).

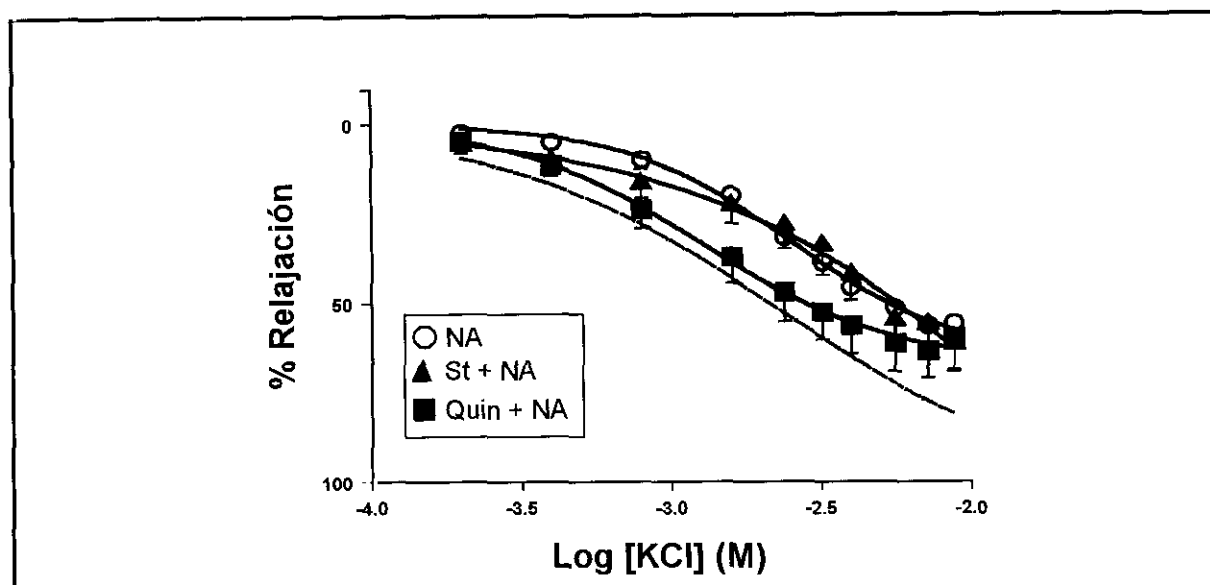


**Figura 42.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora en ausencia o presencia de PMA y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-12).

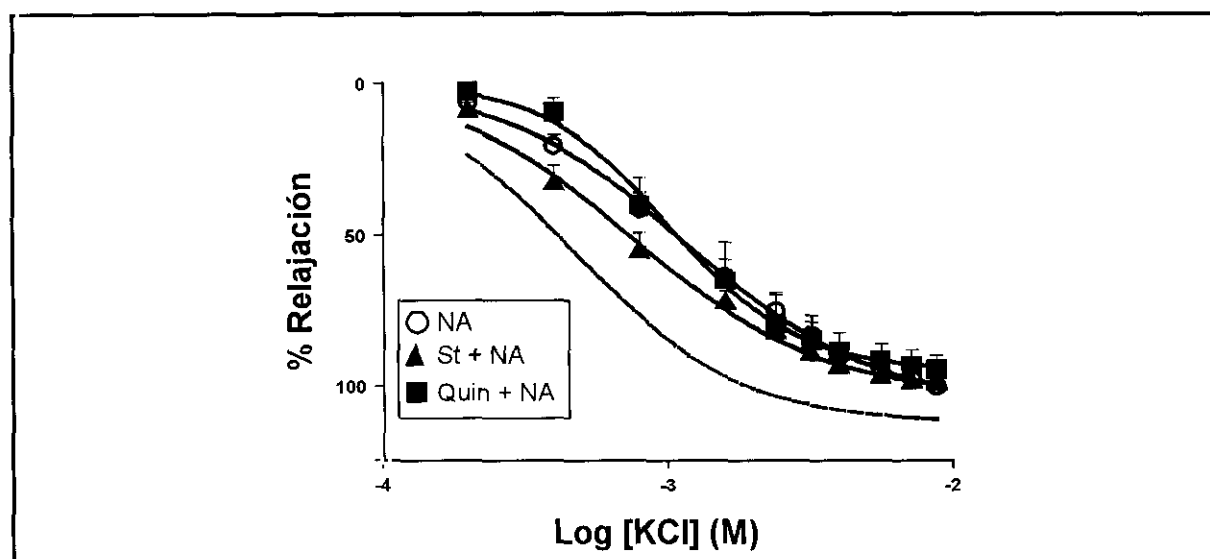


**Figura 43.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora en ausencia o presencia de PMA y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-15).

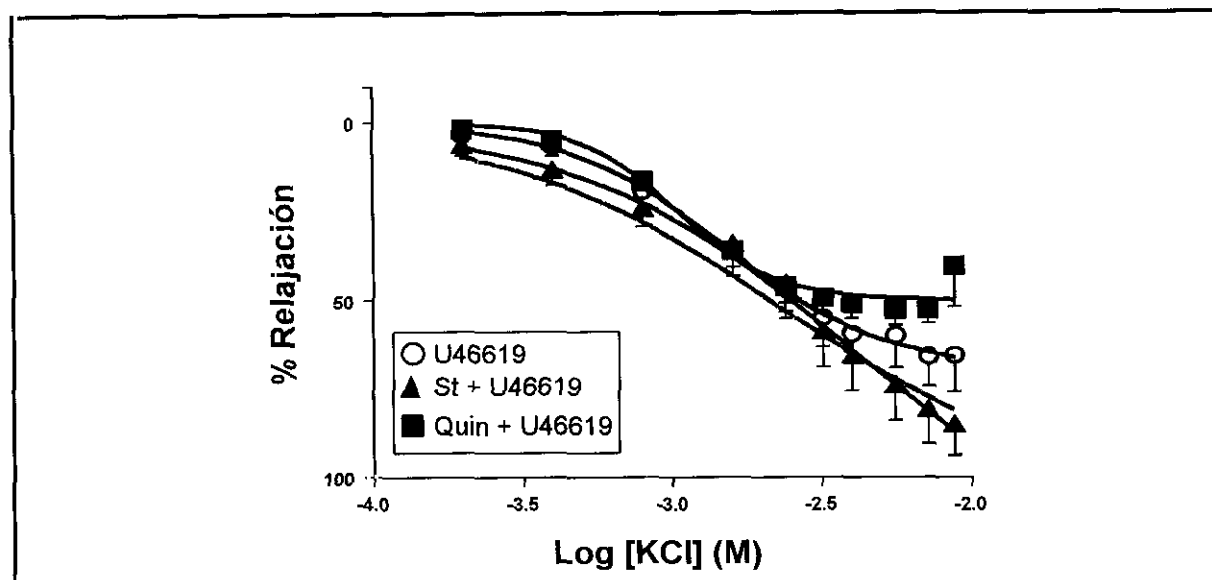
*Efectos de estaurosporina, quinacrina y propanolol.* En estos experimentos se han estudiado las acciones de la estaurosporina y de la quinacrina sobre la relajación inducida por el KCl en arterias estimuladas con NA, U46619, ET-1 o PMA más NA. Ambos inhibidores produjeron una discreta reducción de las respuestas contráctiles a  $0K^+$  y de la inducida por la posterior adición de NA, U46619 y ET-1, si bien este efecto sólo fue significativo para la quinacrina en arterias mesentéricas tratadas con PMA más NA (Tabla 4). La estaurosporina aumentó la máxima respuesta vasodilatadora del KCl en arterias pulmonares tratadas con ET-1 (Fig 48) o U46619 (Fig 46), si bien en estas últimas este incremento no llegó a ser significativo, mientras que no modificó la inhibición inducida por la NA. En arterias mesentéricas, la estaurosporina revirtió parcialmente el desplazamiento de la curva concentración-repuesta al KCl inducido por la NA (Fig 45), el U46619 (Fig 47) y la ET-1 (Fig 49), si bien el efecto era mucho más marcado para estos dos últimos agonistas que para la NA. La quinacrina, por su parte, potenció la relajación inducida por el KCl en arterias pulmonares estimuladas con la NA (Fig 44), el U46619 (Fig 46) o la ET-1 (Fig 48) y en arterias mesentéricas contraídas con el U46619 (Fig 47) (ver resumen en Tabla 4). La quinacrina, sin embargo, no modificó la inhibición inducida por el PMA más NA en arterias pulmonares (Tabla 4 y Fig 50) ni por la NA, la ET-1 o el PMA más NA en arterias mesentéricas (Tabla 4 y Figs 45, 49 y 51, respectivamente). El tratamiento con propanolol, un antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, no afectó a la relajación inducida por KCl en arterias pulmonares o mesentéricas contraídas con NA (Tabla 4).



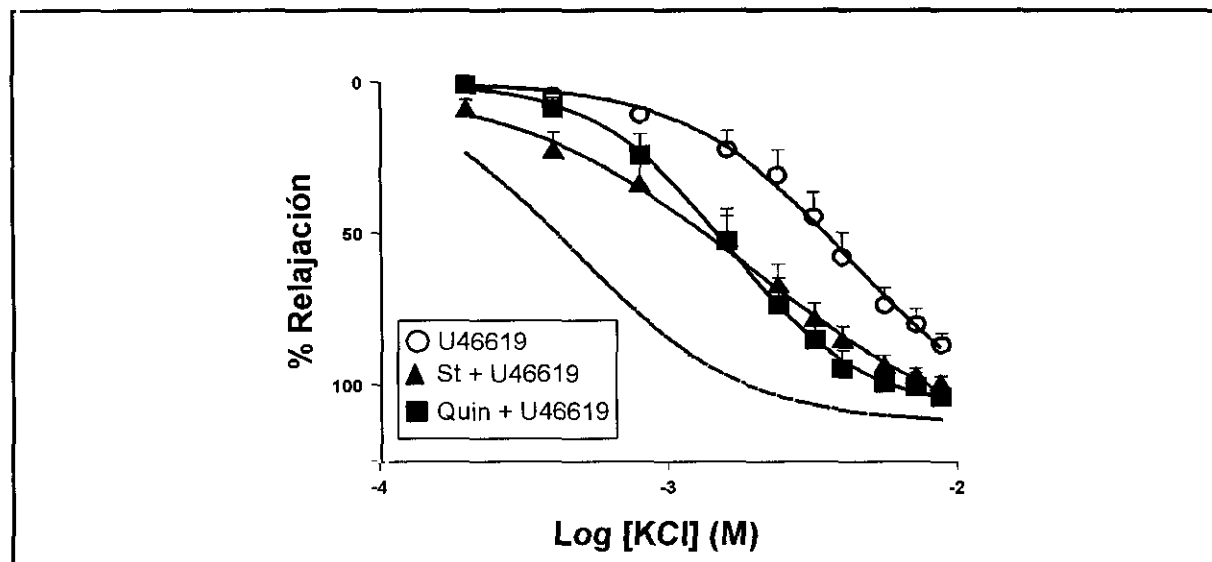
**Figura 44.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 7-12$ ).



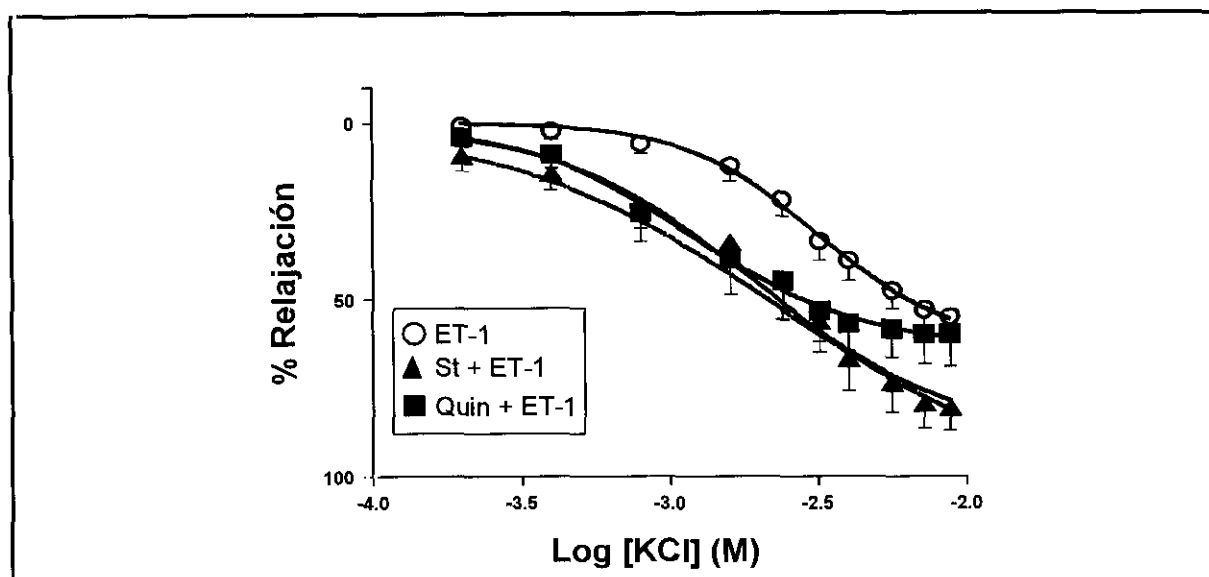
**Figura 45.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . La línea discontinua representa la relajación inducida por el KCl en ausencia de tratamiento (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-15$ ).



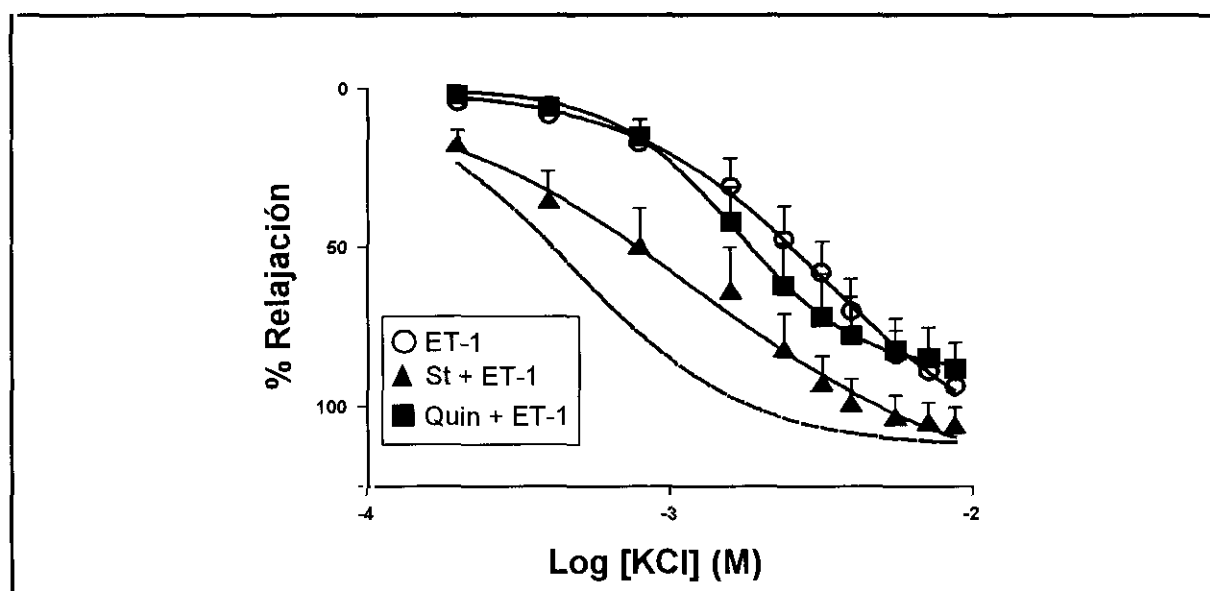
**Figura 46.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a U46619 o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 7-10$ ).



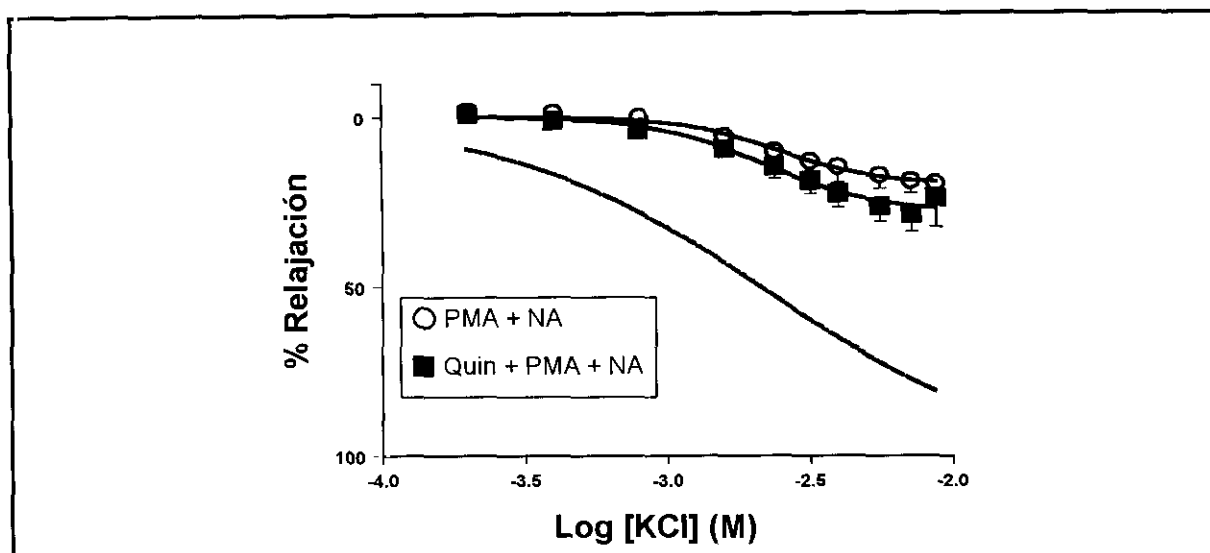
**Figura 47.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a U46619 o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . La línea discontinua representa la relajación inducida por el KCl en ausencia de tratamiento (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 8-12$ ).



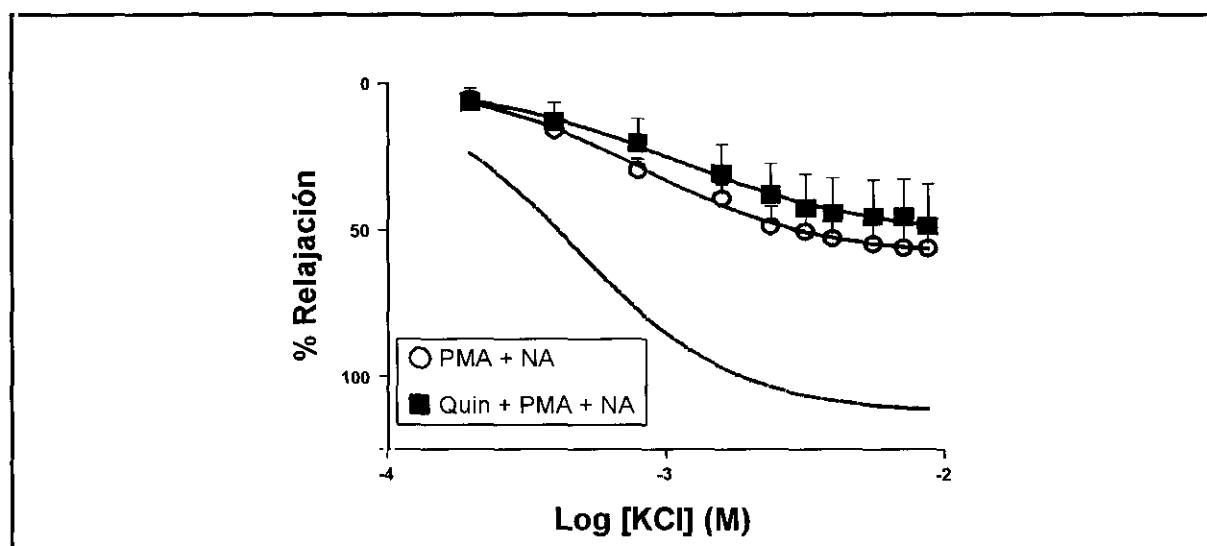
**Figura 48.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a la ET-1 o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 7-9$ ).



**Figura 49.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a ET-1 o vehículo (control, línea discontinua). Algunas arterias fueron tratadas con estaurosporina (St) o quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 5-7$ ).



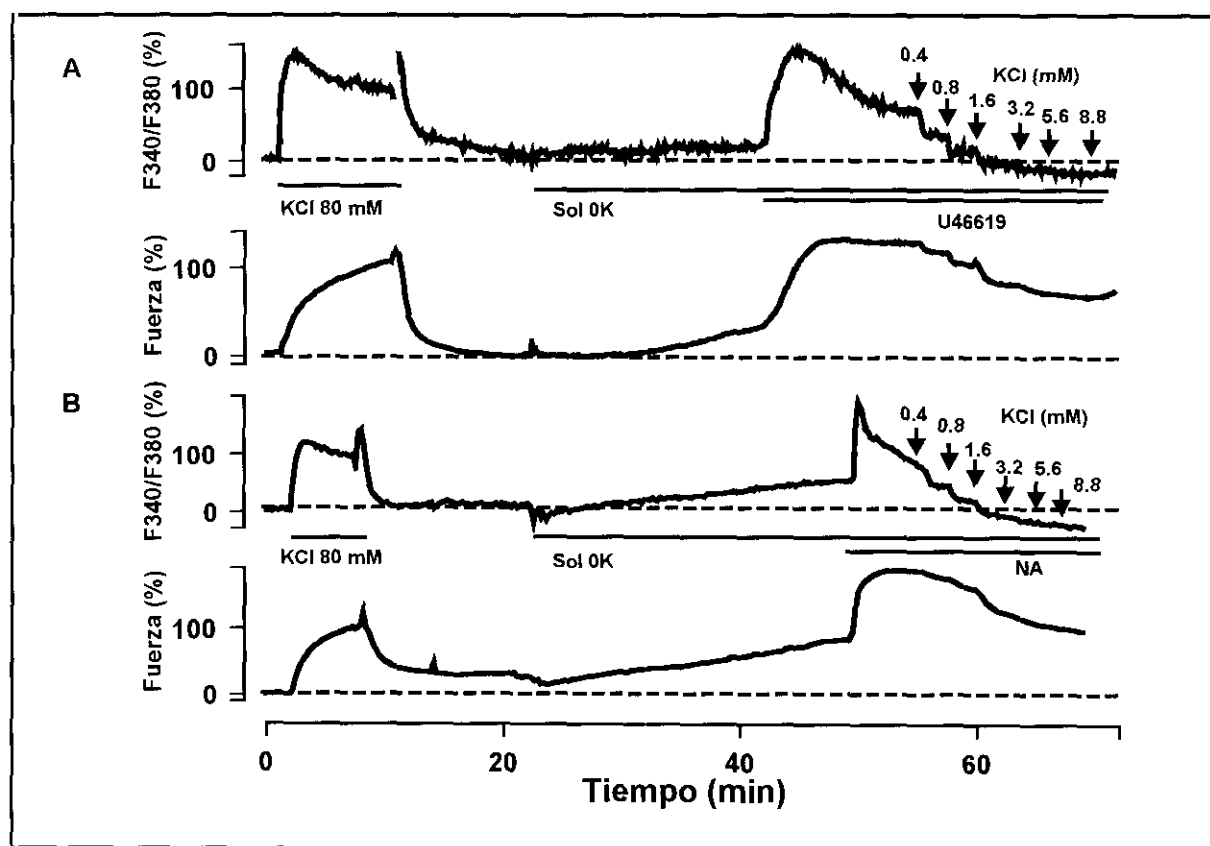
**Figura 50.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas con una solución  $0K^+$  y PMA durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA. Algunas arterias fueron tratadas con quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . La línea discontinua representa la relajación inducida por KCl en ausencia de PMA y NA (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 7-8).



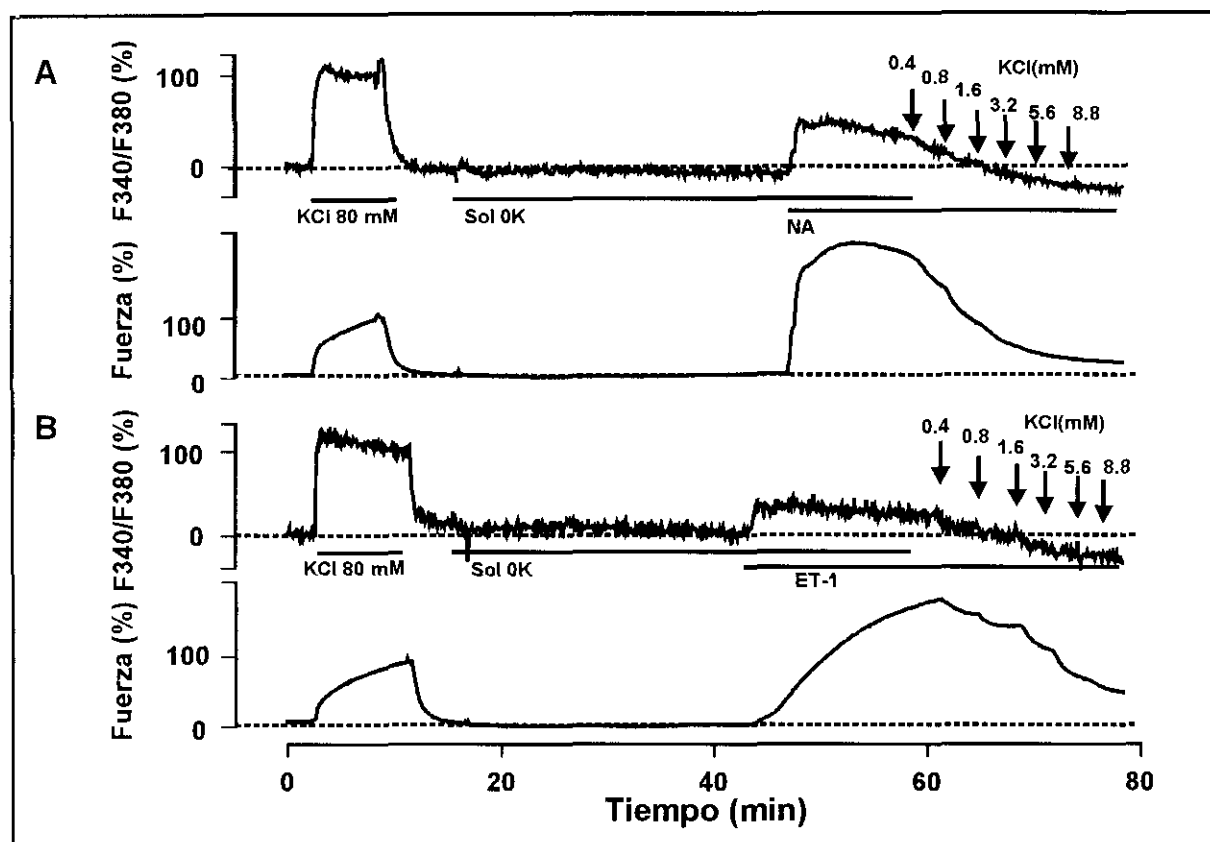
**Figura 51.** Curvas concentración-respuesta de la vasodilatación inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas con una solución  $0K^+$  y PMA durante 1 hora y, posteriormente, expuestas a NA. Algunas arterias fueron tratadas con quinacrina (Quin) inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . La línea discontinua representa la relajación inducida por el KCl en ausencia de PMA y NA (control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. (n = 5-6).

#### IV.IX. Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación y la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por KCl en arterias pulmonares y mesentéricas incubadas en una solución $0K^+$ .

Las Figs 52 y 53 muestran 4 experimentos en los que se registran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , expresados como el cociente F340/F380 y en la fuerza contráctil en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente. Las arterias eran tratadas primero con 80 mM de KCl que producía un rápido aumento del cociente F340/F380 y de la fuerza contráctil. Una vez que la respuesta al KCl se estabilizaba, los anillos se lavaban hasta que el cociente F340/F380 y la fuerza contráctil volvían a niveles basales. La posterior exposición a una solución  $0K^+$  durante 30 minutos produjo un aumento del cociente F340/F380 y de la fuerza contráctil en arterias pulmonares (Fig 52), mientras que no se observaron cambios en arterias mesentéricas (Fig 53).



**Figura 52.** Registros simultáneos de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , expresada como el cociente F340/F380 y en la fuerza contráctil en arterias pulmonares. Las arterias eran primero estimuladas con 80 mM de KCl, y se incubaban en una solución  $0K^+$  durante 30 minutos. A continuación, eran estimuladas con U46619 (parte superior) o NA (parte inferior) y tratadas con concentraciones acumulativas de KCl.



**Figura 53.** Registros simultáneos de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , expresada como el cociente F340/F380 y en la fuerza contráctil en arterias mesentéricas. Las arterias eran primero estimuladas con 80 mM de KCl, y se incubaban en una solución  $0K^+$  durante 30 minutos. A continuación, eran estimuladas con NA (parte superior) o ET-1 (parte inferior) y tratadas con concentraciones acumulativas de KCl.

La adición de KCl (0.4-8.8 mM) en estas condiciones produjo una relajación y una reducción concentración-dependiente del cociente F340/F380 en arterias pulmonares (Figs 54 y 55, respectivamente y Tabla 5), mientras que en las mesentéricas, si bien se redujo el cociente F340/F380 por debajo de los niveles basales, no se observaron cambios en la fuerza contráctil, puesto que no existía contracción (Figs 56 y 57, Tabla 5). La adición de NA, U46619 o ET-1 produjo un aumento del cociente F340/F380 seguido de una respuesta vasoconstrictora tanto en arterias pulmonares (Fig 52) como en las mesentéricas (Fig 53). En arterias pulmonares, el aumento de la fuerza contráctil inducida por estos agonistas fue significativamente mayor al obtenido por arterias control, mientras que el incremento del cociente F340/F380 fue similar en presencia o en ausencia de agonista (Tabla 5). En arterias mesentéricas, el aumento de la fuerza contráctil y del cociente F340/F380 fue similar tras el tratamiento con NA o ET-1 (Tabla 5); el tratamiento con PMA inmediatamente después de la exposición a la solución  $0K^+$  no afectó al cociente F340/F380 o a la fuerza contráctil, pero la posterior adición de NA incrementó ambos hasta niveles similares a los obtenidos en arterias estimuladas con NA o ET-1 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efectos de KCl sobre la fuerza y la  $[Ca^{2+}]_i$  (F340/F380) en arterias pulmonares y mesentéricas control o tratadas con NA, U46619, ET-1 o PMA más NA. Las arterias fueron expuestas a una solución sin  $K^+$  ( $0K^+$ ) durante unos 30 minutos. La NA, el U46619 y la ET-1 fueron añadidos a los 20 minutos de la exposición a  $0K^+$ , mientras que el PMA inmediatamente después de la exposición a  $0K^+$ .

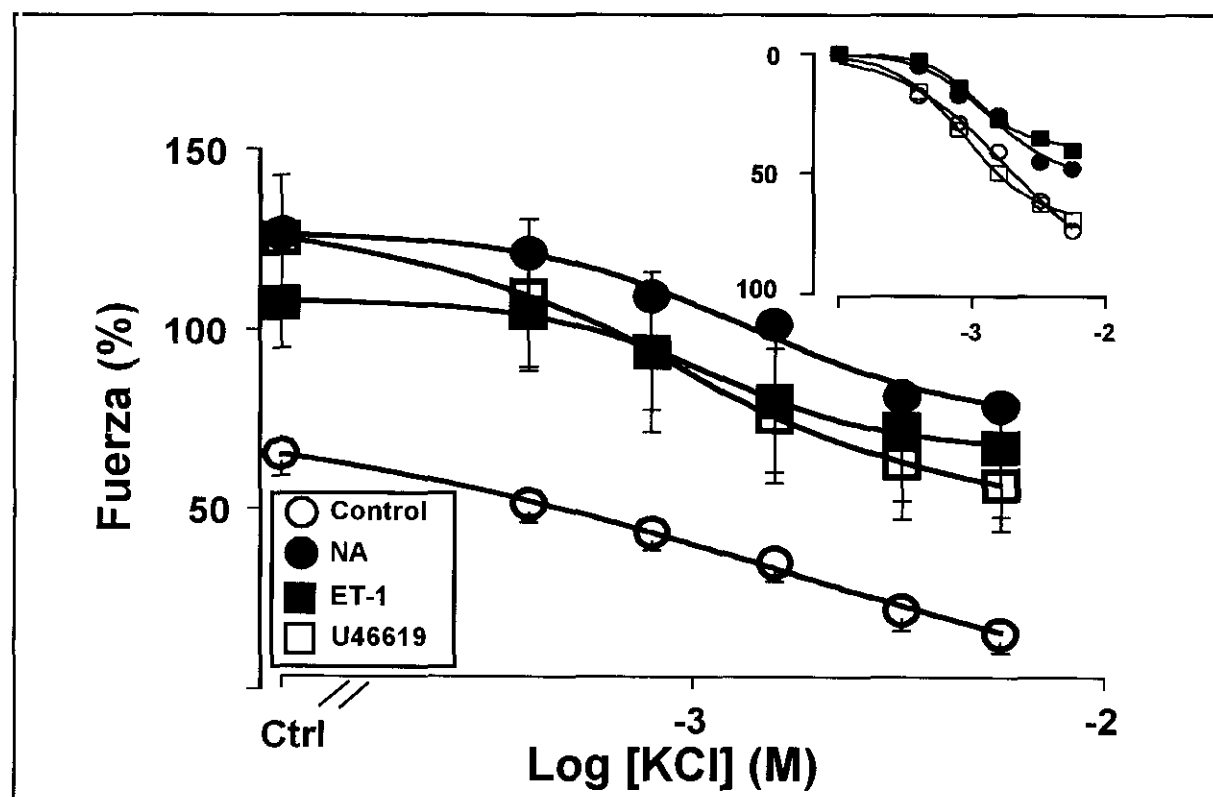
Tratamiento	Fuerza				F340/F380		
	n	Incremento	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>	Incremento	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub>
ARTERIAS PULMONARES							
Control	6	65 ± 6	2.93 ± 0.1	0.8 ± 6	52 ± 13	2.7 ± 0.07	-21 ± 12
NA	5	128 ± 21 *	2.88 ± 0.1	69 ± 13 **	45 ± 11	3.06 ± 0.06 *	-26 ± 4
U46619	4	126 ± 17 *	3.09 ± 0.09	56 ± 11 *	42 ± 6	3.27 ± 0.06 **	-38 ± 13
ET-1	3	107 ± 13 *	2.88 ± 0.07	70 ± 18 *	83 ± 15	3.27 ± 0.14 *	-24 ± 14
ARTERIAS MESENTÉRICAS							
Control	3					2.7 ± 0.1	-84 ± 18
NA	5	203 ± 41	3.2 ± 0.1	9 ± 4	47 ± 14	2.9 ± 0.1	-59 ± 15
NA + PMA	4	187 ± 10	3.1 ± 0.1	17 ± 12	57 ± 17	3.2 ± 0.1 *#	-74 ± 12
ET-1	4	164 ± 20	2.8 ± 0.1 #	27 ± 6	39 ± 6	3.0 ± 0.1 *	-55 ± 7

Incremento es el aumento del tono contráctil (fuerza, mg) o de la señal fluorescente (F340/F380) inducido por los distintos tratamientos antes de la adición del KCl y E<sub>max</sub> es la máxima reducción del tono contráctil (fuerza) o de la señal fluorescente (F340/F380) del KCl, ambos valores expresados como porcentaje de la respuesta inducida por 80 mM de KCl. pD<sub>2</sub> es la concentración de KCl (-log molar) que induce la mitad del máximo efecto vasodilatador. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n experimentos. \* y \*\* P < 0.05 y P < 0.01 vs control, # P < 0.01 vs NA.

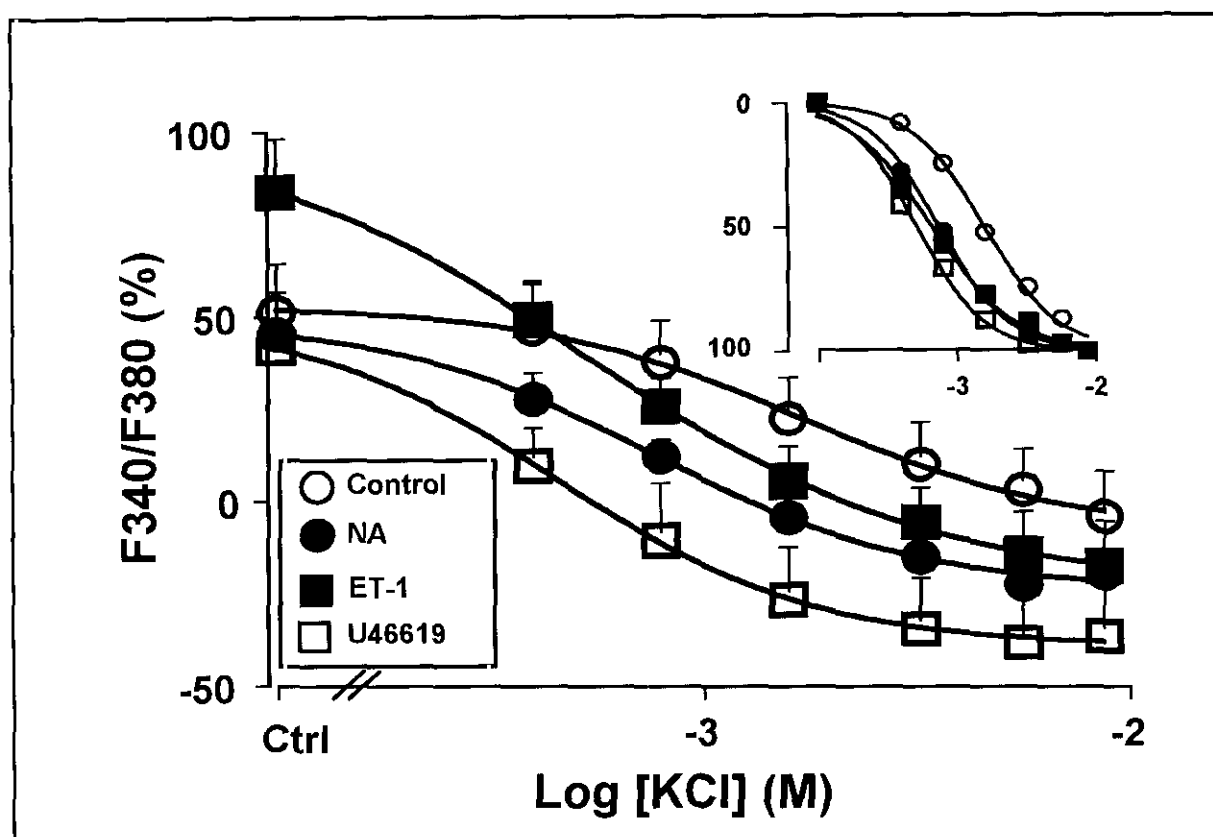
Las Figs 54-57 muestran las curvas de reducción del cociente F340/F380 y de la fuerza contráctil obtenidas tras la adición acumulativa del KCl (0.4-8.8 mM) en arterias pulmonares (Figs 54 y 55) y mesentéricas (Figs 56 y 57) control o tratadas con NA, U46619, ET-1 o NA más PMA. En la parte superior derecha de estas figuras se muestran las curvas normalizadas para permitir una mejor visualización de los resultados. En todos los casos, la reducción del cociente F340/F380 inducido por el KCl alcanzó niveles por debajo de la basal (Figs 55 y 57),

mientras que la disminución de la fuerza se mantuvo por encima de la misma (Figs 54 y 56). La máxima reducción del cociente F340/F380 fue similar en arterias pulmonares y mesentéricas control o tratadas con el agonista, si bien en todos los casos esta reducción fue superior en arterias mesentéricas que en las pulmonares aunque no alcanzase significación estadística (Tabla 5).

En arterias pulmonares, la máxima respuesta vasodilatadora del KCl fue inferior en arterias tratadas con agonista que en las control, si bien en estas últimas se parte de un tono vasoconstrictor menor (Tabla 5 y Fig 54). De tal forma que cuando se representan las curvas normalizadas (parte superior derecha de la Fig 54) se observa una vasodilatación similar en arterias control o tratadas con U46619, mientras que el tratamiento con NA o ET-1 inhibió la máxima respuesta vasodilatadora; estos resultados son similares a los obtenidos en baños de órganos convencionales (Apartado IV.V. y Fig 40). En estas arterias todos los agonistas desplazaron hacia la izquierda la curva de reducción del cociente F340/F380 inducida por KCl, siendo el U46619 el que mayor potenciación producía (Fig 55 y Tabla 5).



**Figura 54.** Cambios en la fuerza contráctil inducidos por el KCl en arterias pulmonares incubadas durante 30 minutos en una solución  $0K^+$  y, posteriormente, tratadas con NA, ET-1, U46619 o vehículo (control). En la parte superior derecha se muestran las mismas curvas normalizadas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 3-6$ ).

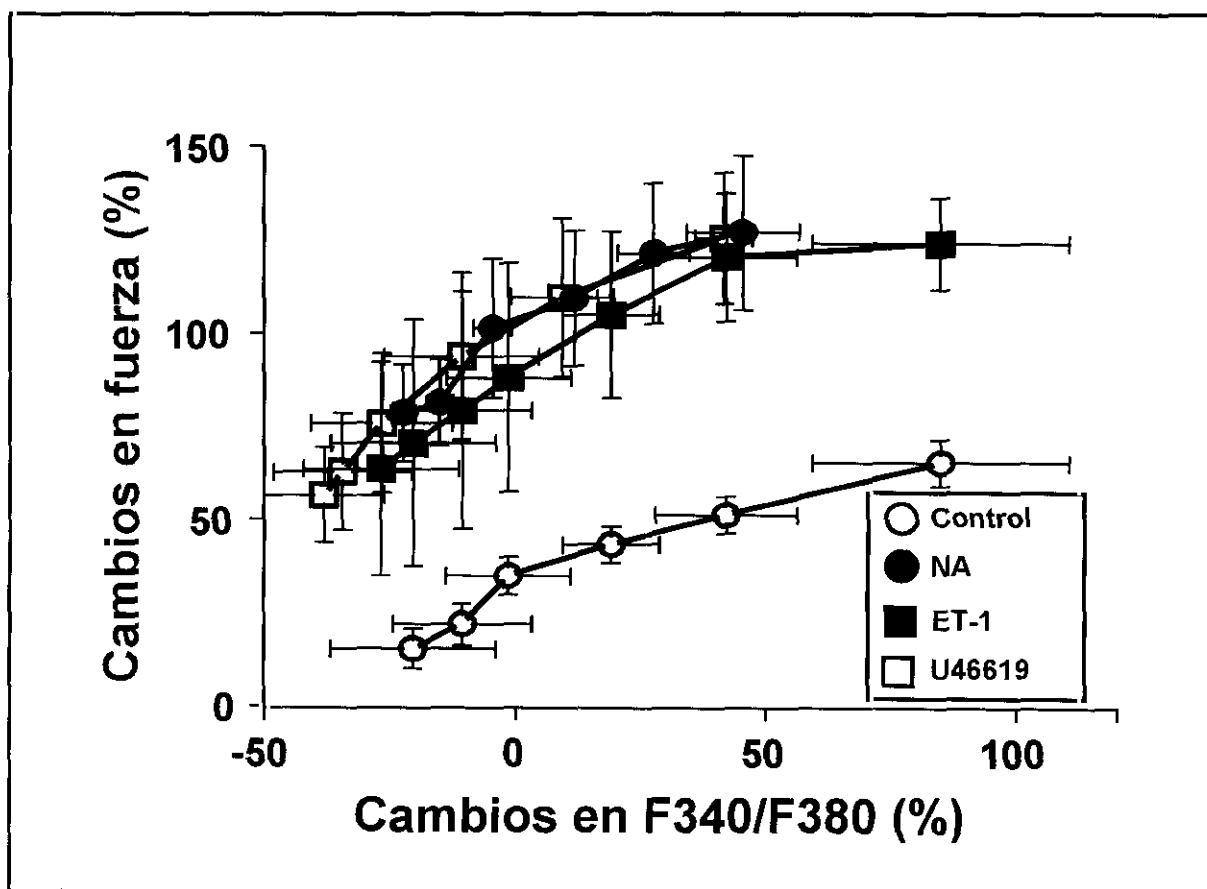


**Figura 55.** Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (F340/F380) inducidos por el KCl en arterias pulmonares incubadas durante 30 minutos en una solución  $0K^+$  y, posteriormente, tratadas con NA, ET-1, U46619 o vehículo (control). En la parte superior derecha se muestran las mismas curvas normalizadas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 3-6$ ).

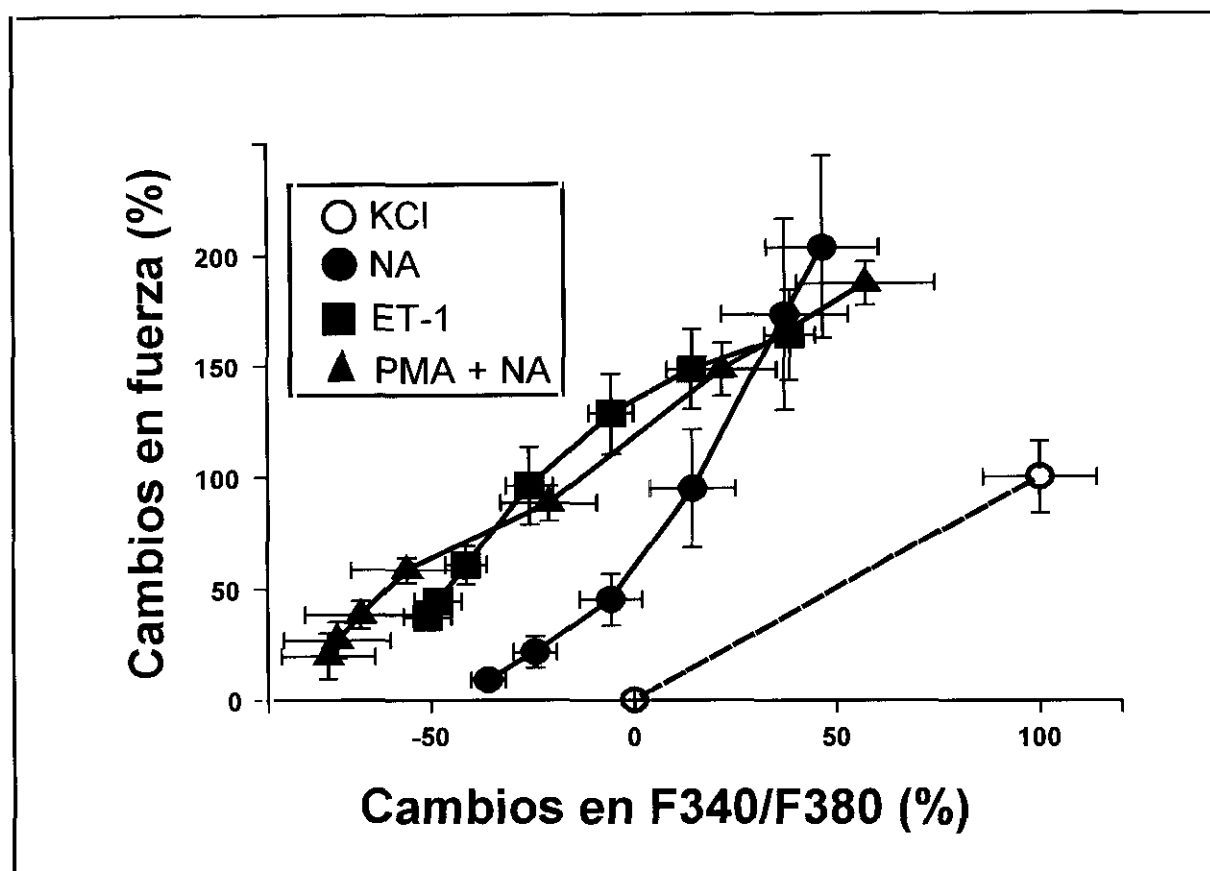
En arterias mesentéricas tratadas con NA, ET-1 o PMA más NA no se observaron diferencias significativas en la máxima reducción de la fuerza contráctil inducida por el KCl (Fig 56 y Tabla 5). Por el contrario, el KCl relajó de forma más potente las arterias contraídas con NA (sola o en presencia de PMA) que aquellas estimuladas con ET-1 (Fig 56 y Tabla 5). Sin embargo, el KCl redujo el cociente F340/F380 de manera similar en arterias estimuladas con NA que en las control (Fig 57 y Tabla 5), mientras que el tratamiento con ET-1 o PMA más NA potenció la reducción del cociente F340/F380 inducida por KCl con respecto a arterias control o estimuladas con NA.



Las Figs 58 y 59 muestran la relación fuerza-F340/F380 de KCl en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente, en situación control o en presencia de NA, U46619, ET-1 o PMA más NA. En las arterias pulmonares, la NA, la ET-1 y el U46619 desplazaron hacia arriba y de forma similar la relación fuerza-F340/F380 del KCl con respecto a las arterias control (Fig 58). En arterias mesentéricas no se pudo representar la relación fuerza-F340/F380 del KCl en arterias control, puesto que no existió contracción ni relajación en esta situación, por lo que se ha incluido la relación fuerza-F340/F380 obtenida tras la adición de 80mM de KCl como referencia. La NA, la ET-1 y el PMA más NA desplazaron hacia arriba la relación fuerza-F340/F380 del KCl con respecto a la obtenida por la despolarización inducida por 80 mM de KCl (Fig 59). Este desplazamiento fue más marcado para ET-1 y PMA más NA que para NA ( $P < 0.05$ ), mientras que no se observaron diferencias entre ET-1 y PMA más NA. Por lo tanto, el KCl produjo una relajación inferior de la que cabría esperar para la reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$  en arterias pulmonares y mesentéricas tratadas con NA, U46619, ET-1 o PMA más NA.



**Figura 58.** Relación fuerza- $[Ca^{2+}]_i$  de la respuesta inducida por el KCl en arterias pulmonares incubadas durante 30 minutos en una solución  $0K^+$  y, posteriormente, tratadas con NA, ET-1, U46619 o vehículo (Control). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 3-6$ ).



**Figura 59.** Relación fuerza- $[Ca^{2+}]_i$  de la respuesta inducida por el KCl en arterias mesentéricas incubadas durante 30 minutos en una solución  $0K^+$  y, posteriormente, tratadas con NA o ET-1. Algunas arterias fueron tratadas con PMA inmediatamente después de la incubación con  $0K^+$ . En línea discontinua se muestra la relación fuerza- $[Ca^{2+}]_i$  obtenida tras la despolarización con 80 mM de KCl. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e. s. m. ( $n = 3-5$ ).

## ***V. DISCUSIÓN***

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la vasodilatación inducida a través de la activación de la vía del NO/GMPc, de los canales  $K_{ATP}$  y de la ATPasa  $Na^+/K^+$  en arterias pulmonares y mesentéricas estimuladas con diversos agentes vasoconstrictores. La relajación inducida a través de la activación de la vía del NO/GMPc y de los canales  $K_{ATP}$  se ha evaluado utilizando los nitrovasodilatadores NPS y SNAP y el levromakalim, un agonista de canales  $K_{ATP}$ , respectivamente. Además, se ha estudiado la asociación de estas dos vías de vasodilatación, bien utilizando combinaciones de NPS y levromakalim o nicorandil, fármaco que estimula ambas vías. Por último, se ha evaluado la relajación inducida por la re-adición del KCl a un medio de incubación sin  $K^+$  ( $0K^+$ ), que está mediada fundamentalmente a través de la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  en nuestras preparaciones experimentales.

### **V.I. Estudio de la vía de vasodilatación del NO/GMPc en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón**

#### *V.I.1. Relajación inducida por la vía del NO/GMPc dependiendo del tipo de arteria y del agente vasoconstrictor.*

En nuestros experimentos, el NPS y el SNAP relajaron totalmente las arterias pulmonares contraídas con NA, mientras que sólo parcialmente las pulmonares contraídas con U46619. Además, el NPS produjo una vasodilatación completa de arterias mesentéricas contraídas con NA o U46619. La potencia vasodilatadora del NPS fue inferior en arterias pulmonares contraídas con U46619 que en el resto. Por lo tanto, ambos fármacos presentaban en común una reducida eficacia vasodilatadora en arterias pulmonares contraídas con U46619. Resultados similares ya habían sido observados en nuestro laboratorio con otros fármacos que actúan a distintos niveles de la vía de vasodilatación del NO/GMPc, tales como la acetilcolina, el 8-bromo GMPc y el péptido natriurético auricular (Pérez-Vizcaíno et al., 1997).

En los experimentos realizados en el baño de órganos acoplado al fluorímetro, el U46619 y la NA produjeron un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  similar al observado en presencia de 80 mM de KCl, si bien la respuesta contráctil era mayor que la producida por este último; es decir, que en arterias pulmonares, U46619 y NA incrementaron la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ , fenómeno que ya había sido descrito en diversos territorios vasculares (Karakí y cols., 1997). Himpens y cols. (1990) demostraron que el U46619 produce mayor sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  que la NA en arterias pulmonares de conejo. En este estudio, sin embargo, los aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la fuerza contráctil observados en arterias estimuladas con NA o U46619 fueron similares. La adición de NPS produjo una vasodilatación que fue precedida de una reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$ , siendo ambos procesos concentración-dependientes. Al igual que en los experimentos en baños de órganos convencionales, el NPS presentó una menor eficacia vasodilatadora en arterias precontraídas con U46619 que en las contraídas con NA; sin embargo, no se observaron diferencias en la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el NPS en arterias contraídas con ambos agonistas. Estos resultados indican que la menor relajación a NPS observada en arterias pulmonares contraídas

con U46619 no es debida a una acción de este agonista sobre la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el NPS.

*V.I.2. Mecanismo de la relajación de la vía NO/GMPc en arterias pulmonares y mesentéricas.*

El NPS produce relajación del músculo liso vascular a través de la liberación de NO, el cual puede actuar activando la guanilato ciclasa soluble y aumentando los niveles intracelulares de GMPc (Ignarro y cols., 1986; Kowaluk y cols., 1992; Rapoport y cols., 1985) o a través de mecanismos independientes de GMPc (Bolotina y cols., 1994; Plane y cols., 1998). En este estudio, la relajación inducida tanto por el NPS en arterias pulmonares y mesentéricas, como por el SNAP en las primeras, fue inhibida muy marcadamente por el ODO, independientemente del agente vasoconstrictor empleado, lo que confirma que sus efectos están mediados fundamentalmente a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble y el aumento de los niveles intracelulares de GMPc.

Para estudiar los posibles mecanismos que conducen al efecto vasodilatador inducido por el GMPc se llevaron a cabo diversos protocolos experimentales (ver apartado III.IV.4). Se ha descrito que tanto la incubación en un medio  $0K^+$  como el tratamiento con ouabaína producen la inhibición de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Hendrickx y Casteels, 1974; Webb y Bohr, 1978). Ambos tratamientos inhibieron marcadamente la vasodilatación inducida por el NPS en arterias mesentéricas, pero no la modificaron en las pulmonares; estos resultados indicaban que la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  desempeña un papel importante en la vasodilatación inducida por el NPS en arterias mesentéricas, pero no en las pulmonares. Cuando se eleva la  $[K^+]_o$  por encima de 30 mM el potencial de membrana se aproxima al potencial de equilibrio del  $K^+$  ( $E_K$ ), de forma que la activación de los canales de  $K^+$  es relativamente ineficaz para producir vasodilatación (Quayle y cols., 1997). En estas condiciones ( $[K^+]_o = 80mM$ ), el nifedipino relajó totalmente las arterias pulmonares y mesentéricas y, la posterior adición de NA produjo una respuesta similar en las primeras pero inferior en las segundas con respecto a la generada en ausencia del tratamiento. Sin embargo, este tratamiento no modificó la máxima respuesta vasodilatadora del NPS en arterias pulmonares, e incluso la aumentó en las mesentéricas, lo que sugiere que ni la activación de canales de  $K^+$  ni el bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L están implicados en su efecto vasodilatador. La mayor respuesta vasodilatadora inducida por el NPS en arterias mesentéricas expuestas a este tratamiento puede ser atribuida, por un lado, al menor tono existente antes de la adición de NPS, seguramente debido a que la contracción inducida por la NA es muy sensible al nifedipino en estas arterias (Pérez-Vizcaíno y cols., 1996), y por otro, a que la elevación de la  $[K^+]_o$  aumenta la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Vasilets y Schwarz, 1993), que es uno de los principales mecanismos responsables de la acción vasodilatadora producida por el NPS en estas arterias.

El tratamiento con tapsigargina durante 45 minutos, produjo una respuesta vasoconstrictora que aparecía al cabo de unos 15 minutos. Este tratamiento inhibió muy marcadamente la vasodilatación inducida por el NPS, tanto en arterias pulmonares como mesentéricas, lo que indica que el NPS produce su vasodilatación, en gran medida, a través de la activación de la

SERCA. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores en diversas preparaciones experimentales (Cohen y cols., 1999; Khan y cols., 1998; Rashatwar y cols., 1987.) En experimentos realizados en el baño de órganos acoplado al fluorímetro, la tapsigargina produjo un rápido aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que no se acompañó de cambios en la fuerza contráctil, quizás porque en estos experimentos el tiempo de incubación fue de tan sólo 10 minutos. Esta disociación entre el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la fuerza contráctil tras la inhibición de la SERCA podría atribuirse a un aumento local de  $Ca^{2+}$  en un compartimento alejado del aparato contráctil de la CMLV (Karaki y cols., 1997; Nomura y cols., 1997; Tosun y cols., 1998). La tapsigargina inhibió muy marcadamente la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el NPS, un hallazgo que ya había sido descrito para el NO u otros dadores de NO (Cohen y cols., 1999; Karaki y cols., 1997). Al igual que habíamos observado en los experimentos realizados en baños de órganos, la tapsigargina inhibió la relajación producida por el NPS; sin embargo, hubo una enorme disociación entre los efectos inhibitorios sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la fuerza contráctil, de forma que a pesar de que la tapsigargina prácticamente abolió la reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$ , todavía fue posible observar un importante efecto vasodilatador. Estos resultados indican que parte del efecto vasodilatador del NPS está relacionada con su capacidad para modificar la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ , bien porque la reduce directamente o porque disminuye el aumento de sensibilidad inducido por el agonista.

### *V.I.3. Mecanismo de la interacción del U46619 y la vía del NO/GMPc en arterias pulmonares.*

La vía del NO/GMPc relaja de forma similar las arterias pulmonares estimuladas con NA o ET-1 y las mesentéricas contraídas con NA, ET-1 o U46619 (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997), luego los mecanismos que median esta vasodilatación parecen carecer de selectividad vascular por cualquiera de estos territorios. Sin embargo y como se ha descrito en el apartado V.I.1, esta vía de vasodilatación presenta una menor respuesta en arterias pulmonares estimuladas con U46619. Este efecto es específico de las arterias pulmonares, ya que no ocurre en arterias mesentéricas o coronarias y tampoco afecta a la vía del AMPc (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). En la presente Tesis Doctoral se demuestra que esta menor respuesta vasodilatadora no es consecuencia de un efecto directo del U46619 sobre la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el NPS, ya que el NPS disminuyó la  $[Ca^{2+}]_i$  de manera similar en arterias contraídas con NA o U46619. Además, el U46619 no parece producir una mayor sensibilización de las proteínas contráctiles que la NA, por lo que la menor relajación producida por el NPS en arterias estimuladas con U46619 no puede ser atribuida a una mayor acción de éste que de la NA sobre la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ . El mecanismo final por el que se produce una menor respuesta vasodilatadora al NPS en arterias estimuladas con U46619 es todavía desconocido, aunque en base a nuestros resultados cabrían dos posibles interpretaciones: a) que el U46619 pudiera interferir con el mecanismo mediante el cual el NPS reduce la sensibilidad de las proteínas contráctiles o b) que los mecanismos por los que NA o U46619 sensibilizan las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  presenten distinta sensibilidad a la acción vasodilatadora del NPS.

La estimulación de la PKC con ésteres de forbol también reduce la relajación inducida por el SNP (Morrison y Pollock, 1990; Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). Además, la estaurosporina, un inhibidor de la PKC, aumenta la vasodilatación inducida por el NPS en arterias pulmonares contraídas con U46619, pero no en aquéllas contraídas con NA (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). En esta Tesis Doctoral, la estaurosporina no modificó la reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el NPS, mientras que aumentó su efecto vasodilatador. Sin embargo y, de forma sorprendente, la estaurosporina cuando se asoció a U46619 (a una concentración superior) indujo un aparente aumento de la sensibilidad de las proteínas contractiles por el  $Ca^{2+}$  con respecto a la observada en presencia del U46619 sólo; es decir, que aumentó la relación fuerza /  $[Ca^{2+}]_i$ . Por lo tanto, la sensibilización de las proteínas contráctiles inducida por el U46619 no parece estar mediada a través de la activación de la PKC. De hecho, los agonistas pueden producir sensibilización al  $Ca^{2+}$  a través de mecanismos diferentes a los de los ésters de forbol, que son activadores específicos de la PKC (Hori y cols., 1993). La diferente sensibilidad a la acción de la estaurosporina que presentan la contracción inducida por el U46619 y la relajación inducida por el NPS sugiere que sería incorrecta la segunda interpretación propuesta en el párrafo anterior, según la cual el U46619 podría aumentar la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  a través de un mecanismo que fuese menos sensible a la acción del NPS. Así pues, los resultados de esta Tesis Doctoral indican que el U46619 interacciona con el componente de vasodilatación del NPS que implica la desensibilización de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  a través de un mecanismo que es sensible al inhibidor de la PKC estaurosporina.

En conclusión, el NPS presenta una menor relajación en arterias pulmonares de lechón contraídas con U46619 que en aquéllas contraídas con NA, pero en ambas situaciones reduce la  $[Ca^{2+}]_i$  de forma similar. El NPS produce vasodilatación de las arterias pulmonares de lechón disminuyendo la  $[Ca^{2+}]_i$  fundamentalmente a través de la activación de la SERCA y reduciendo la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  (Fig 60). La interacción entre el U46619 y el GMPc no implica cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , pero sí en la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$  y está mediada a través de un mecanismo que es sensible al inhibidor de la PKC estaurosporina (Fig 60). Pensamos que la inhibición de la vía de vasodilatación del NO/GMPc producida tras la activación de receptores de  $TXA_2$  puede estar implicada en el desarrollo de hipertensión pulmonar y en el fracaso terapéutico del NO inhalado que ocurre en muchos pacientes con HPPN.

## V.II. Estudio de la activación de los canales $K_{ATP}$ en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón

En nuestras preparaciones, la relajación inducida por el levcromakalim está mediada fundamentalmente a través de la activación de los canales  $K_{ATP}$ , ya que se inhibió marcadamente por la glibenclamida, un inhibidor selectivo de los mismos. La glibenclamida se comporta aparentemente como un antagonista competitivo de los agonistas de canales  $K_{ATP}$  (ACP) (Eltze, 1989; Cogolludo y cols., 1998); sin embargo, interacciona con un sitio de unión específico situado en la subunidad SUR, que es diferente (Gopalakrishnan y cols., 1991; Bray

y Quast, 1992) y se encuentra acoplado alostéricamente y de forma negativa al de los ACP (Bray y Quast, 1992; Schwanstecher y cols., 1992). La glibenclamida produjo una vasodilatación en arterias pulmonares contraídas con U46619, ya que se ha descrito que a este nivel actúa como un inhibidor competitivo de los receptores del TXA<sub>2</sub> (Cocks y cols., 1990). Sin embargo, la glibenclamida apenas modificó el tono vascular inducido por el U46619 en arterias mesentéricas. Este efecto pudiera deberse a la utilización de una concentración superior de U46619 en arterias mesentéricas o a que realmente, la glibenclamida tenga un mayor efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por el U46619 en arterias pulmonares que sistémicas, como ha sido previamente descrito (Kaye y cols., 1997).

La apertura de los canales K<sub>ATP</sub> produce hiperpolarización y vasodilatación, fundamentalmente como consecuencia del cierre de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Fig 60), por lo que los ACP podrían comportarse indirectamente como bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup>. Sin embargo, los ACP se comportan de forma diferente a los bloqueantes de los canales de Ca<sup>2+</sup> (Bray y cols., 1991; Cook y cols., 1988), lo que indica que presentan mecanismos vasodilatadores alternativos (Quast, 1993). En esta Tesis Doctoral, la relajación inducida por el levcromakalim dependió del territorio vascular estudiado, siendo unas 3-6 veces más potente y efectivo en arterias mesentéricas que pulmonares. Las arterias mesentéricas también fueron más sensibles a la acción de verapamil (esta Tesis Doctoral) y nifedipino (Pérez-Vizcaíno y cols., 1996), pero, al contrario que el levcromakalim, relajaron más potentemente las arterias contraídas con NA que con U46619. El diferente comportamiento vasodilatador mostrado por el levcromakalim y los bloqueantes del Ca<sup>2+</sup> indica que otro/s mecanismo/s distinto/s al cierre de canales de Ca<sup>2+</sup> median la relajación inducida por el levcromakalim.

El levcromakalim relajó las arterias pulmonares contraídas con NA o U46619 con valores de pD<sub>2</sub> y E<sub>max</sub> muy similares a los descritos por otros autores en arterias pulmonares de conductancia de lechones de 2 semanas de vida (Boels y cols., 1997) y de cerdos adulto contraídos con PGF<sub>2α</sub> (Ward y cols., 1991). El apricalim, otro ACP, también presenta mayor potencia para relajar las arterias mesentéricas que las pulmonares de conejo, aunque con una eficacia similar (Magnon y cols., 1994). Estos resultados indican que el levcromakalim presenta una mayor selectividad por el territorio sistémico que por el pulmonar independientemente del agente vasoconstrictor empleado. Sin embargo, en situaciones de hipertensión pulmonar, los ACP pueden presentar una mayor selectividad por el territorio pulmonar que por el sistémico (Wanstall, 1996), posiblemente debido a que en estas situaciones las arterias de resistencia pulmonares, al igual que sucede a nivel sistémico (Struijker-Boudier y cols., 1992), se hacen más sensibles a la activación de los canales K<sub>ATP</sub> (Rodman, 1992; Wanstall, 1996). Por otro lado, y al contrario de lo que sucede con la vía del NO/GMPc (Tulloh y cols., 1997; Abman y cols., 1991), la vasodilatación inducida por la activación de los canales K<sub>ATP</sub> es similar a lo largo de la etapa perinatal, parece ser independiente del agente vasoconstrictor empleado y persiste en diversas formas experimentales de hipoxia e hipertensión, entre ellas la HPPN (Boels y cols., 1997; Rodman, 1992; Wanstall, 1996). Por todo ello, se ha sugerido que la activación de canales K<sub>ATP</sub> podría representar una alternativa en el tratamiento de la HPPN.

### V.III. Combinación de la activación de la vía del NO/GMPc y de los canales $K_{ATP}$ en arterias pulmonares

Para estudiar el posible papel de la activación de ambas vías de señalización se realizaron dos abordajes experimentales: a) la combinación del NPS y el levcromakalim o b) la utilización del nicorandil, fármaco que actúa como dador de NO y activador de los canales  $K_{ATP}$ .

#### V.III.1. Relajación inducida por la combinación de NPS y levcromakalim.

Como se ha descrito en los apartados anteriores, tanto el NPS como el levcromakalim produjeron una vasodilatación de aproximadamente un 50-60% en arterias pulmonares contraídas con U46619. Sin embargo, el NPS produjo una relajación total de estas arterias cuando éstas habían sido parcialmente relajadas con una dosis previa de levcromakalim y el  $E_{max}$  del levcromakalim aumentó en arterias pretratadas con NPS. Del mismo modo, la combinación de NPS y levcromakalim (1:1) relajó totalmente estas arterias.

La combinación de NPS y levcromakalim ha permitido, además, estudiar las posibles interacciones entre ambos mecanismos de acción. La existencia de interacciones, tanto positivas como negativas, entre la vía del GMPc y la de los canales  $K_{ATP}$  ha sido descrita en numerosos trabajos (Feleder y Adler-Graschinsky, 1997; Herity y cols., 1994; McCulloch y Randall, 1996; Shinbo e Iijima, 1997). Sin embargo, en otros estudios no se han encontrado interacciones entre ambos mecanismos (Cogolludo y cols., 1999; Gardiner y cols., 1991; White y Hiley, 1998 a y b). En la presente Tesis Doctoral se ha realizado un análisis isoblográfico a partir de las curvas de relajación de NPS, levcromakalim y su combinación (1:1). El punto de la combinación se ajusta a la línea de aditividad del isoblograma, lo que sugiere la ausencia de interacciones entre ambas vías; es decir, que sus efectos son aditivos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los experimentos de pretratamiento con dosis únicas de un fármaco y curvas de relajación con el otro, ya que no hubo diferencias en los valores de  $pD_2$  en arterias en ausencia y en presencia del pretratamiento.

#### V.III.2. Relajación inducida por el nicorandil.

El nicorandil es un fármaco que produce la relajación del músculo liso vascular a través de la activación de los canales  $K_{ATP}$  (al igual que el levcromakalim) y de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y el posterior aumento de los niveles de GMPc (al igual que el NPS) (Fig 60). Por lo tanto, el nicorandil comparte propiedades de ACP y nitrovasodilatadores. La contribución relativa de cada mecanismo a su acción vasodilatadora puede variar dependiendo del territorio vascular estudiado y del agente vasoconstrictor empleado para precontraer el vaso (Akai y cols., 1995; Borg y cols., 1991; Magnon y cols., 1994; Meisheri y cols., 1991). En la presente Tesis Doctoral, el tratamiento con nicorandil relajó con igual eficacia las arterias pulmonares y mesentéricas, independientemente del agente vasoconstrictor empleado (NA o U46619), si bien con mayor potencia las arterias mesentéricas que las pulmonares. Sin

embargo, como muestran las figuras 28-31, la contribución de cada mecanismo en la vasodilatación inducida por el nicorandil dependió del agente vasoconstrictor y del territorio vascular. Magnon y cols. (1994) describieron que el mecanismo responsable de la relajación inducida por el nicorandil era diferente para una misma arteria contraída con KCl o NA. Nuestros resultados demuestran que el nicorandil actúa a través de distintos mecanismos de acción en una misma arteria estimulada por agentes vasoconstrictores (NA y U46619) que comparten una señal de transducción común (estimulación de receptores acoplados a proteínas G). Para estudiar la contribución de cada mecanismo en la vasodilatación inducida por el nicorandil se han utilizado como herramientas farmacológicas el ODQ y la glibenclamida. En arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con U46619, el nicorandil parece actuar a través de ambos mecanismos, puesto que tanto el ODQ como la glibenclamida inhibieron su efecto vasodilatador. Por el contrario, en arterias pulmonares contraídas con NA el principal mecanismo involucrado en la relajación de nicorandil parece ser la activación de la guanilato ciclasa soluble, ya que sus efectos relajantes fueron inhibidos por ODQ, mientras que no se modificaron por el tratamiento con glibenclamida, sola o en combinación con ODQ. En arterias mesentéricas contraídas con NA, el ODQ también inhibió la relajación producida por el nicorandil, mientras que la glibenclamida no la modificó. Sin embargo, la glibenclamida, en presencia de ODQ, desplazó marcadamente a la derecha la curva de relajación a nicorandil, indicando que en esta situación ambos mecanismos son responsables de la relajación inducida por éste. En resumen, la activación de la guanilato ciclasa parece mediar la relajación a nicorandil en las distintas condiciones experimentales estudiadas, mientras que la contribución de la activación de canales  $K_{ATP}$  resulta más variable.

Aún cuando las causas de la variabilidad en el mecanismo de acción del nicorandil son desconocidas, estos resultados podrían tener dos interpretaciones :

- 1) Por un lado, suponiendo que en determinadas condiciones experimentales un mecanismo resulta más efectivo que el otro, se podría esperar que el nicorandil actuara preferiblemente a través de ese mecanismo. Esto podría explicar por qué : a) en arterias pulmonares contraídas con NA, que son relajadas de forma más efectiva por NPS que por levcromakalim, el nicorandil actúe preferiblemente a través de la estimulación de la guanilato ciclasa; b) en arterias pulmonares y mesentéricas contraídas con U46619, que son relajadas con una eficacia similar por NPS y levcromakalim, el nicorandil actuaría a través de ambos mecanismos. Sin embargo, esta hipótesis no parece explicar que la escasa diferencia en la eficacia vasodilatadora de NPS y levcromakalim en arterias mesentéricas contraídas con NA sea responsable de la insensibilidad del nicorandil a la acción inhibitoria de la glibenclamida.
- 2) Una segunda hipótesis sería que existiera una interacción entre ambas vías de vasodilatación, lo que explicaría por qué en arterias mesentéricas contraídas con NA, la potencia inhibitoria de la glibenclamida y del ODQ aumenta cuando ambos fármacos se utilizaban en combinación. Un aumento similar de la actividad inhibitoria de la glibenclamida sobre la vasodilatación producida por el nicorandil se ha descrito tras la inhibición de la guanilato ciclasa con azul de metileno (Kreye y cols., 1992) o tras la inducción de tolerancia a los nitratos en arterias coronarias de cerdo (O'Rourke, 1996). Asumiendo la posibilidad de interacciones negativas entre ambas vías, la glibenclamida inhibiría el componente agonista de los canales  $K_{ATP}$  ejercido por el nicorandil, lo que a su vez disminuiría la interacción negativa que la apertura

de estos canales estaba ejerciendo sobre la vía del GMPC, y, así, podría aumentar la potencia del nicorandil como estimulante de la guanilato ciclasa. Sin embargo, la ausencia de interacciones entre NPS y levcromakalim en nuestras condiciones experimentales (apartado anterior) rechaza esta segunda hipótesis.

En resumen, los resultados de la combinación de ambos mecanismos, bien utilizando nicorandil o la asociación de NPS y levcromakalim permite eliminar el componente de contracción resistente a cada mecanismo por separado en arterias pulmonares, lo que indica que el mecanismo responsable de la resistencia a la relajación inducida por NPS es distinto que el de levcromakalim.

#### V.IV. Estudio de la activación de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$

##### V.VI.1. Vasodilatación inducida por KCl en arterias incubadas en una solución $0\text{K}^+$ .

Los cambios en la  $[\text{K}^+]_o$  desempeñan un papel muy importante en la regulación de la presión y flujo sanguíneos (Edwards y cols., 1998; Knot y cols., 1996; Quayle y cols., 1997). El aumento de la  $[\text{K}^+]_o$  puede producir hiperpolarización y relajación de la CMLV a través de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  o de los canales  $\text{K}_{\text{IR}}$ , dependiendo de la  $[\text{K}^+]_o$  inicial y de la preparación estudiada (Bukoski y cols., 1983; Edwards y cols., 1998; Knot y cols., 1996; Ponte y cols., 1996; Quayle y cols., 1997; Webb y Bohr, 1978). El reciente descubrimiento de que el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF) es  $\text{K}^+$  liberado del endotelio que hiperpolariza y relaja las CMLV a través de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y de los canales  $\text{K}_{\text{IR}}$  (Edwards y cols., 1998) demuestra la importancia de estos mecanismos en el control del tono vascular. En esta Tesis Doctoral, la adición de KCl (0.2-8.8 mM) produjo una vasodilatación concentración-dependiente en arterias incubadas en una solución  $0\text{K}^+$  que fue prácticamente eliminada en presencia de ouabaína y no se afectó por  $\text{BaCl}_2$ , lo que indicaba que estaba mediada fundamentalmente a través de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . El mecanismo responsable de la relajación inducida tras la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  parece implicar la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediada a través de la hiperpolarización de la membrana y el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y/o a través de la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Fig 60). La inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  produce una respuesta vasoconstrictora que ha sido atribuida a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Iwamoto y cols., 1992) o de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Zhu y cols., 1994). En nuestros experimentos, la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  tras la incubación en una solución  $0\text{K}^+$  durante 1 hora produjo una respuesta vasoconstrictora que era relajada por concentraciones acumulativas de KCl. En experimentos realizados en el fluorímetro la exposición a  $0\text{K}^+$  durante 30 minutos (el tiempo de incubación debió ser drásticamente reducido para evitar una pérdida excesiva de fura-2) produjo una respuesta contráctil en arterias pulmonares pero no así en las mesentéricas. La posterior re-adición del KCl relajó las arterias pulmonares controles o tratadas con un agonista y las mesentéricas sólo si éstas habían sido previamente estimuladas con NA o ET-1. Sin embargo, en todos los casos, la re-adición del KCl produjo una reducción concentración-dependiente en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Luego la existencia

de un respuesta contráctil no constituye un requisito esencial para que el KCl produzca relajación, lo que sugiere que aunque ambos fenómenos se inician, respectivamente, a partir de la inhibición y la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , los mecanismos que conducen a la contracción y a la vasodilatación son diferentes. De hecho, la adición de KCl relajó totalmente las arterias mesentéricas expuestas a la solución  $0\text{K}^+$  más agonista y no sólo el componente de la contracción debido a la solución  $0\text{K}^+$ .

#### *V.VI.2. Efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la vasodilatación inducida por KCl.*

La actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase puede ser modulada por diversos estímulos fisiológicos (Ewart y Klip, 1995; Xia y cols., 1995). La ET-1 estimula la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en aorta de conejo (Gupta y cols., 1991) y en el endotelio capilar (Kawai y cols., 1995) a través de la activación de la PKC. Los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos también incrementan la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en arteria femoral de perro y en la vena safena (Navran y cols., 1988), si bien, este efecto no se observó en el caso de la NA en cultivos de CMLV de aorta de rata (Brock y cols., 1982a).

En esta Tesis Doctoral, el PMA (un activador de la PKC) no modificó la potencia, pero inhibió marcadamente la máxima respuesta vasodilatadora del KCl en arterias pulmonares y mesentéricas, si bien de forma mucho más marcada en las primeras. En arterias pulmonares la NA y la ET-1, pero no el U46619 disminuyeron la máxima respuesta vasodilatadora inducida por el KCl, pero ninguno modificó su potencia. En arterias mesentéricas, la NA, el U46619 y la ET-1 desplazaron a la derecha la curva de relajación del KCl pero no modificaron su máxima respuesta vasodilatadora. Dado que estos agonistas activan la PKC, esta vía de transducción podría estar implicada en el efecto inhibitorio de la NA, la ET-1 y el U46619 sobre la vasodilatación inducida por la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Xia y cols. (1995) han descrito que la PKC puede estimular directamente la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e inhibirla indirectamente a través de la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ . Por tanto, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la posible implicación de la activación de la PKC y de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  en los efectos de NA, U46619, ET-1 y PMA sobre la relajación inducida por el KCl.

En arterias mesentéricas, la estaurosporina, un inhibidor de la PKC, revirtió parcialmente la acción inhibitoria de la NA, la ET-1 y el U46619 sobre la vasodilatación inducida por KCl, mientras que la quinacrina, un inhibidor de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , sólo revirtió parcialmente la acción inhibitoria del U46619. Estos resultados indicaban que los tres agonistas actúan en parte a través de la activación de la PKC, mientras que la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  sólo parece mediar parte del efecto inhibitorio del U46619 en arterias mesentéricas. En arterias pulmonares, la presencia de estaurosporina revirtió totalmente la acción inhibitoria de la ET-1, mientras que no modificó la inhibición inducida por la NA. El tratamiento con quinacrina potenció la vasodilatación inducida por KCl en arterias estimuladas con NA, U46619 o ET-1, lo que sugiere que estos agentes pueden estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a través de la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ . Sin embargo, la quinacrina en ningún caso aumentó la máxima respuesta vasodilatadora inducida por el KCl, lo que indica que la

activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> no está implicada en la acción inhibitoria de la NA y la ET-1 sobre la relajación inducida por KCl.

Por lo tanto, los agentes vasoconstrictores estudiados inhibieron la relajación inducida por la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, aunque este efecto inhibitorio fue de características distintas según el tipo de arteria. En arterias pulmonares, estos agonistas redujeron la máxima respuesta vasodilatadora del KCl, mientras que en las mesentéricas sólo inhibieron su potencia. Esta diferencia en el tipo de inhibición inducida por estos agentes vasoconstrictores puede en parte explicarse teniendo en cuenta que la activación de la PKC a través del tratamiento con PMA inhibió mucho más marcadamente la máxima respuesta vasodilatadora del KCl en las arterias pulmonares que en las mesentéricas, luego es lógico que la activación de la PKC inducida por NA, U46619 o ET-1 inhiba más la máxima relajación del KCl en arterias pulmonares que en las mesentéricas.

En cualquier caso, el efecto inhibitorio de los agonistas sobre la relajación inducida por el KCl parece estar mediado a través de la activación de la PKC, ya que en todos los casos fue revertido, en parte, por la estaurosporina, salvo en el caso de las arterias pulmonares estimuladas con NA, ello sugiere que la NA actúa a través de un mecanismo independiente de la PKC. Esta menor sensibilidad de los efectos de la NA a la acción de la estaurosporina está en concordancia con el hecho de que en arterias pulmonares el U46619, pero no la NA, inhibió la relajación al NPS a través de un mecanismo sensible a estaurosporina. Además, en arterias mesentéricas, la acción inhibitoria de la NA sobre la vasodilatación inducida por el KCl es mucho menos sensible a la acción de la estaurosporina que la inducida por ET-1 o U46619. La activación de los receptores β-adrenérgicos produce el aumento de los niveles intracelulares de AMPc y la activación de la PKA, la cual inhibe la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en diversas preparaciones experimentales (Bertorello y cols., 1991; Borin, 1995); éste podría ser el mecanismo implicado en la acción inhibitoria de la NA sobre la vasodilatación inducida por el KCl. Tanto en arterias pulmonares como en las mesentéricas, el tratamiento con propanolol, un bloqueante de receptores β-adrenérgicos, no modificó la vasodilatación inducida por KCl, indicando que la posible estimulación del receptor β-adrenérgico y el posterior aumento de los niveles de AMPc no están implicados en los efectos inducidos por la NA.

En resumen, estos resultados sugieren que la NA, el U46619 y la ET-1, a través de la activación de la PKC, inhiben la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y, como consecuencia, la relajación inducida por ésta. Sin embargo, como veremos a continuación, los resultados obtenidos con el análisis de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> no fueron consistentes con esta hipótesis.

### *V. VI.3. Cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y fuerza contráctil inducidos por KCl*

A pesar de que el principal mediador de la contracción de la CMLV es el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, algunos agonistas y los ésteres de forbol pueden producir una mayor respuesta contráctil de la que cabría esperar para un determinado aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; es decir, que

producen una sensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Karaki y cols., 1997). Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que la NA, el U46619, la ET-1 y el PMA más NA aumentaron la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$ .

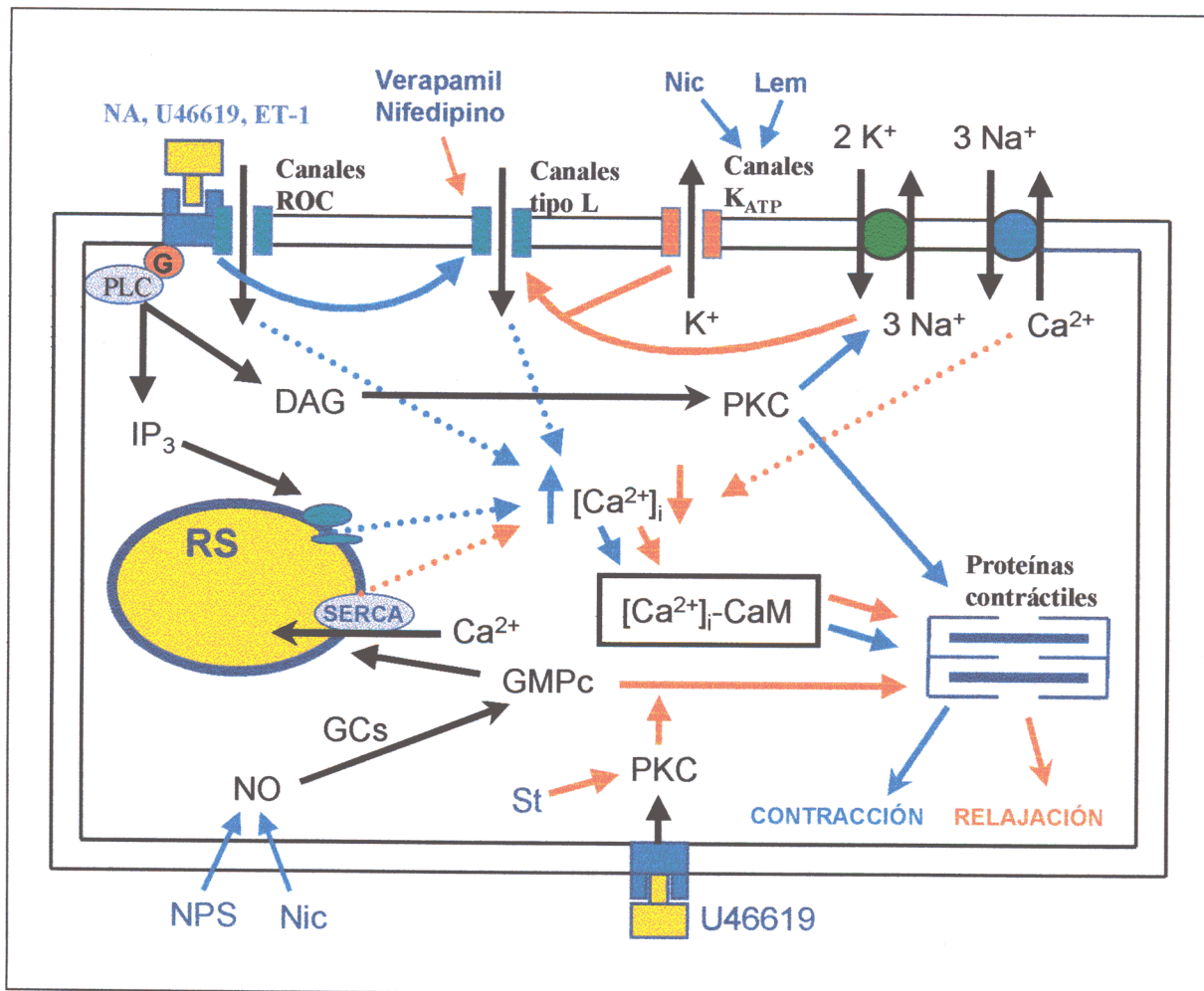
Con el objeto de analizar la posible implicación de la sensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$  en la menor respuesta vasodilatadora que mostraba el KCl en las arterias tratadas con NA, U46619, ET-1 o PMA más NA estudiamos los cambios simultáneos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en la fuerza inducidos por el KCl en arterias en ausencia y presencia de estos agonistas. Los cambios de la fuerza contráctil fueron similares en arterias montadas en el baño acoplado al fluorímetro que en aquéllas incubadas en baños de órganos convencionales, excepción hecha de que en estas últimas la exposición a la solución  $0\text{K}^+$  no produjo una respuesta contráctil en las arterias mesentéricas y que la exposición a PMA no redujo la máxima respuesta vasodilatadora inducida por KCl. Estas diferencias pensamos que podrían explicarse, en parte, a un menor tiempo de incubación en la solución  $0\text{K}^+$  (40 minutos en vez de 80 minutos). La NA, la ET-1 y en mayor medida el U46619 potenciaron la reducción en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por el KCl en arterias pulmonares y la ET-1 y el PMA en arterias mesentéricas. Estos resultados sugieren que estos agonistas estimulan la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y, por lo tanto, su capacidad para producir la disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y son consistentes con los obtenidos en estudios de la recaptación de  $^{86}\text{Rb}^+$  (Gupta y cols., 1991). Sin embargo, no se puede descartar que estos agentes pudiesen actuar a otro nivel de la vía de transducción que va desde la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (p.ej. el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ). Sin embargo, en arterias pulmonares tratadas con NA apenas se observó potenciación en la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por KCl. En resumen, todos los agentes inhibieron la relajación inducida por el KCl, excepto el U46619 en arterias pulmonares, y potenciaron la disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , excepto la NA en arterias mesentéricas.

La relación fuerza- $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (fuerza-F340/F380) obtenida tras el tratamiento con concentraciones acumulativas de KCl en arterias estimuladas con NA, U46619, ET-1 o PMA más NA se desplazó hacia arriba y hacia la izquierda con respecto a las arterias control o a la respuesta inducida por 80 mM de KCl en arterias pulmonares y mesentéricas, respectivamente; es decir, que en presencia de estos agonistas se obtenía una menor reducción de la fuerza contráctil de la que se debería obtener para una determinada reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Por lo tanto, la aparente contradicción que supone el hecho de que NA, U46619, ET-1 y PMA más NA inhiban la relajación pero estimulen la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por el KCl se explica por la capacidad de estos agentes por producir sensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$ . NA, U46619 y ET-1 pueden aumentar la sensibilidad de la contracción de la CMLV por el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación de la PKC, por lo que el efecto de la estaurosporina sobre la relajación inducida por el KCl podría atribuirse a su acción inhibitoria agente sobre la sensibilización de las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$  más que a cambios en la actividad de la ATPasa inducidos por el KCl.

Estos resultados están en concordancia con otros estudios que proponen que la relajación inducida por el KCl tras la incubación en una solución  $0\text{K}^+$  puede ser empleada como un

indicador funcional de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ya que el primer acontecimiento que tiene lugar es la activación del enzima (Ponte y cols., 1996; Webb y Bohr, 1978); sin embargo, este método no refleja la actividad de la ATPasa de forma precisa, puesto que pueden existir otros factores que afecten a la relajación sin que se altere la actividad enzimática (Bukoski y cols., 1983). Por lo tanto, se pueden obtener diferencias en la relajación inducida por el KCl en distintas condiciones experimentales, aún cuando la acción real sobre la actividad de la ATPasa sea nula o incluso se estimule la actividad del enzima (Bukoski y cols., 1983).

En conclusión, la NA, el U46619, la ET-1 y el PMA son inhibidores funcionales de la relajación inducida por la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en arterias pulmonares y mesentéricas de lechones recién nacidos. Este efecto se produce aun cuando la acción directa sobre la actividad enzimática pueda ser estimulante más que inhibidora (Fig 60). Esta aparente paradoja puede explicarse porque todos estos agonistas sensibilizan las proteínas contráctiles por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 60) y por lo tanto, la relajación y la reducción en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que siguen a la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no muestran un comportamiento paralelo.



**Figura 60.** Esquema de los principales mecanismos de transducción de las vías estudiadas en esta Tesis Doctoral en arterias pulmonares de lechones recién nacidos. Las flechas azules representan activación/estimulación (continuas) y aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (discontinuas) y las rojas inactivación/inhibición (continuas) y reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  (discontinuas). La NA, el U46619 y la ET-1 se unen a sus respectivos receptores acoplados a proteína G, dando lugar a la formación de  $IP_3$ , que produce la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS, y de DAG que activa la PKC, la cual aumenta la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ . Estos agonistas, además, aumentan la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales VOC y ROC. El NPS libera NO que estimula la GCs produciendo el aumento de los niveles de GMPC; este nucleótido cíclico produce relajación por dos mecanismos: estimulación de la recaptación de  $Ca^{2+}$  al RS a través de la SERCA y disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ . Este segundo mecanismo de vasodilatación es inhibido por el U46619 a través de un mecanismo sensible a estaurosporina (St), un inhibidor de la PKC. La activación de los canales K<sub>ATP</sub> (tras el tratamiento con levcromakalim, Lem) y de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> produce hiperpolarización y disminución de la de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La activación de la PKC por los agonistas estimula la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. El nicorandil (Nic) puede actuar como dador de NO y como agonista de los canales K<sub>ATP</sub>.

## ***VI. CONCLUSIONES***

1. La activación de la vía del NO/GMPc, de los canales  $K_{ATP}$  y de la ATPasa  $Na^+/K^+$  y el bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L producen una vasodilatación de las arterias pulmonares y mesentéricas de lechones recién nacidos, si bien estos tres últimos mecanismos de señalización presentan una mayor selectividad por el territorio sistémico que por el pulmonar. Estos resultados sugieren que las arterias pulmonares presentan una menor sensibilidad que las mesentéricas a la vasodilatación inducida por cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (hiperpolarización de la membrana y bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$ ). Estas diferencias no parecen ser consecuencia de una menor efectividad de las distintas vías de vasodilatación para reducir la  $[Ca^{2+}]_i$ , sino de una menor sensibilidad del lecho pulmonar a la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por lo tanto, la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  parece desempeñar un papel limitado en la vasculatura pulmonar, por lo que el tratamiento de la hipertensión pulmonar con agentes vasodilatadores que actúen únicamente a través de la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  puede resultar en muchos casos ineficaz.

2. La activación de la vía del NO/GMPc relaja las arterias pulmonares de lechón por dos mecanismos: a) una reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediada a través de la activación de la SERCA y b) una disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, esta vía no parece producir hiperpolarización de la membrana, puesto que la inhibición de los canales de  $K^+$  o de la ATPasa  $Na^+/K^+$  no modifica su efecto relajante. Por el contrario, en las arterias mesentéricas, no sólo la activación de la SERCA, sino también la de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , están implicadas en la vasodilatación inducida por esta vía.

3. El hecho de que la vía del NO/GMPc produzca una menor vasodilatación en arterias pulmonares estimuladas con un agonista de receptores del  $TXA_2$  no es debido a un efecto de este agente sobre la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ , sino a una acción específica sobre la desensibilización de las proteínas contráctiles por el  $Ca^{2+}$ , a través de un mecanismo sensible a la estaurosporina, un inhibidor de la PKC. Esta interacción podría estar implicada en el desarrollo de hipertensión pulmonar y en el fracaso terapéutico del NO inhalado que se observa en muchos pacientes con HPPN.

4. La activación de la vía del NO/GMPc y de los canales  $K_{ATP}$  produce vasodilatación de las arterias pulmonares por mecanismos independientes, pero aditivos, de tal modo, que la combinación de ambas vías permite obtener una vasodilatación completa en situaciones en las que cada mecanismo por separado produce una relajación parcial.

5. La NA, el TXA<sub>2</sub> y la ET-1 producen una vasoconstricción pulmonar que es debida al aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y a la sensibilización de las proteínas contráctiles por el Ca<sup>2+</sup> y, además, son capaces de modular las distintas vías de vasodilatación. Así, p.ej. el TXA<sub>2</sub> inhibe la desensibilización de las proteínas contráctiles por el Ca<sup>2+</sup> inducida por la vía NO/GMPc y la NA, el TXA<sub>2</sub> y la ET-1 estimulan la reducción de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, aunque este efecto puede quedar enmascarado por el aumento de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el Ca<sup>2+</sup> que todos ellos producen.

## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***

- Abe A. y Karaki H. Effects of forskolin on cytosolic  $Ca^{2+}$  level and contraction in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; **249**: 895-900.
- Abman S., Shanley P. y Accurso F. Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs. *J. Clin. Invest.* 1989; **83**: 1849-1858.
- Abman S., Chatfield B., Hall S. y McMurtry I. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of the pulmonary circulation at birth. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: H1921-H1927.
- Abman S., Chatfield B., Rodman D., Hall S. y McMurtry I. Maturation changes in endothelium-derived relaxing factor activity of ovine pulmonary arteries *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 1991; **260**: L280- L285.
- Adamson I. Development of lung structure. En: *The Lung: Scientific Foundations*. Ed: R. Crystal y J. West. Raven Press, New York. 1991: 711-729.
- Aguilar-Bryan L., Clement J., González G., Kunjilwar K., Babenko A. y Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiol. Rev.* 1998; **78**: 227-245.
- Akai K., Wang Y., Sato K., Sekiguchi N., Sugimura A., Kumagai T., Komaru T., Kanatsuka H. y Shirato K. Vasodilatory effect of nicorandil on coronary arterial microvessels: its dependency on vessel size and the involvement of the ATP-sensitive potassium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; **26**: 541-547.
- Albarwani S., Heinert G., Turner J. y Kozłowski R. Differential  $K^+$  channel distribution in smooth muscle cells isolated from the pulmonary arterial tree of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; **208**: 183-189.
- Archer S., Huang J., Hampl V., Nelson D., Shultz P. y Weir E. Nitric oxide and cyclic GMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; **91**: 7583-7587.
- Archer S., Huang J., Henry T., Peterson D. y Weir E. A redox-based sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ. Res.* 1993; **73**: 1100-1112.
- Archer S., Tolins J., Rajj L. y Weir E. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium-derived relaxing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **164**: 1198-1205.
- Ashcroft F., Harrison D. y Ashcroft S. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 1984; **312**: 446-448.

- Ashford M., Bond C., Blair T. y Adelman J. Cloning and functional expression of a rat heart  $K_{ATP}$  channel. *Nature* 1994; **370**: 456-459.
- Ashford M., Sturgess N., Trout N., Gardner N. y Hales C. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Arch.* 1988; **412**: 297-304.
- Assali N., Kirschbaum A. y Dilts P. Effects of hyperbaric oxygen on uteroplacental and fetal circulation. *Circ. Res.* 1968; **22**: 573-588.
- Balwierzczak J. The relationship of  $KCl$ - and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -mediated increases in tension of the porcine coronary artery with changes in intracellular  $Ca^{2+}$  measured with fura-2. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **104**: 373-378.
- Banerjee A., Roman C. y Heymann M. Bradykinin receptor blockade does not affect oxygen-mediated pulmonary vasodilation in fetal lambs. *Pediatr. Res.* 1994; **36**: 474-480.
- Barer G. Active control of the pulmonary circulation. En: *Pulmonary Circulation in Health and Disease*. Ed: G. Cumming y G. Bonsignore. Plenum Press, New York. 1980: 81-124.
- Barer G. Reactivity of the vessels of collapsed and ventilated lungs to drugs and hypoxia. *Circ. Res.* 1966; **18**: 336.
- Barman S. Potassium channels modulate pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 1998; **275**: L64-L70.
- Barnes P. y Liu S. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol. Rev.* 1995; **47**: 87-131.
- Barst R., Rubin L., Long W., McGoon M., Rich S., Badesch D., Groves B., Tapsos V., Bourge R., Brundage B., y cols. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension: The Primary Pulmonary Hypertension study group. *N. Engl. J. Med.* 1996; **334**: 296-302.
- Beech D.J., Zhang H., Nakao K. y Bolton T.  $K^+$  channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 1993; **110**: 573-582.
- Beguin P., Beggah A., Chibalin A., Burgener-Kairuz P., Jaisser F., Mathews P., Rossier B., Cotecchia S. y Geerings K. Phosphorylation of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit by protein kinase A and C *in vitro* and in intact cells. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 24437-24445.
- Benham C. y Tsien R. A novel receptor-operated  $Ca^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; **328**: 275-278.

- Bergofski E. y Holtzman S. A study of the mechanisms involved in the pulmonary arterial pressor response to hypoxia. *Circ. Res.* 1967; **20**: 506-519.
- Bertorello A., Aperia A., Walaas S., Nairn A. y Greengard P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 11359-11362.
- Blaustein M.P. Endogenous ouabain: role in the pathogenesis of hypertension. *Kidney Int.* 1996; **49**: 1748-1753.
- Blaustein M.P., Ashida T., Goldman W.F., Wier W.G. y Hamlyn J.M.. Sodium calcium exchange in vascular smooth muscle: a link between sodium metabolism and hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; **448**: 199-216.
- Boels P., Gao B., Deutsch J. y Haworth S. ATP-dependent K<sup>+</sup> channel activation in isolated normal and hypertensive newborn and adult porcine pulmonary vessels. *Pediatr. Res.* 1997; **42**: 317-326.
- Boels P., Tulloh R. y Haworth S. K<sub>(ATP)</sub> channels in neonatal pulmonary vessels during normal development and chronic hypoxia. En: *The Resistance Arteries: Integration of the Regulatory Pathways*. Ed: W. Halpern. Humana Press, Totowa, N.J. 1994: 213-224.
- Bolotina V., Najibi S., Palacino J., Pagano P. y Cohen R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; **368**: 850-853.
- Bonev A. y Nelson M. Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *J. Gen. Physiol.* 1996; **108**: 315-323.
- Borg C., Mondot S., Mestre M. y Cavero I. Nicorandil: differential contribution of K<sup>+</sup> channel opening and guanylate cyclase stimulation to its vasorelaxant effects on various endothelin-1-contracted arterial preparations. Comparison to aprikalim (RP 52891) and nitroglycerin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; **259**: 526-534.
- Borin M. cAMP evokes a rise in intracellular Na<sup>+</sup> mediated by pump inhibition in rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1995; **269**: C884-C891.
- Borin M., Tribe R. y Blaustein M. Increased intracellular Na<sup>+</sup> augments mobilization of Ca<sup>2+</sup> from SR in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: C311-C317.
- Braner D., Fineman J. y Change R. M and B 22948, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, is a pulmonary vasodilator in lambs. *Am. J. Physiol.* 1993; **264**: H252-H258.
- Bray K., Newgreen D., Small R., Southerton J., Taylor S., Weir S. y Weston A. Evidence that the mechanism of the inhibitory action of pinacidil in rat and guinea-pig smooth muscle

- differs from that of glyceryl trinitrate. *Br. J. Pharmacol.* 1987; **91**: 421-429.
- Bray K. y Quast U. A specific binding site for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 11689-11692.
- Bray K., Weston A., Duty S., Newgreen D., Longmore J., Edwards G. y Brown T. Differences between the effects of cromakalim and nifedipine on agonist-induced responses in rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **102**: 337-344.
- Brayden J. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: H668-H673.
- Brayden J. y Nelson M. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992; **256**: 532-535.
- Brigham K. y Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; **133**: 913-927.
- Brock T., Lewis L. y Smith J. Angiotensin increases Na<sup>+</sup> entry and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982a; **79**: 1438-1442.
- Brock T., Smith J. y Overbeck H.W. Relationship of vascular sodium-potassium pump activity to intracellular sodium in hypertensive rats. *Hypertension* 1982b; **4**: 43-48.
- Bukoski R., Seidel C. y Allen J. Differences in K<sup>+</sup>-induced relaxation of canine femoral and renal arteries. *Am. J. Physiol.* 1983; **245**: H598-H603.
- Buzzard C., Pfister S. y Campbell W. Endothelium dependent contraction in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A<sub>2</sub>. *Circ. Res.* 1993; **72**: 1023-1034.
- Bychkov R., Gollasch M., Steinke T., Ried C., Friedrich C. y Haller H. Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; **285**: 293-298.
- Campbell W., Gebremedhin D., Pratt P. y Harder D. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 1996; **78**: 415-423.
- Cassin S., Dawes G., Mott J., Ross B. y Strang L. The vascular resistance of the foetal and newly ventilated lung of the lamb. *J. Physiol.* 1964; **171**: 61-79.
- Catravas J., Buccafusco J. y Kashef H. Effects of acetylcholine in the pulmonary circulation of rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984; **231**: 236-241.
- Chang J., Moore P., Fineman J., Soifer S. y Heymann M. K<sup>+</sup> channel pulmonary vasodilation

- in fetal lambs: role of endothelium derived nitric oxide. *J. Appl. Physiol.* 1992; **73**: 188-194.
- Chen C., Voelkel N. y Chang S. Pulmonary vascular reactivity: effect of PAF and PAF antagonists. *J. Appl. Physiol.* 1992; **73**: 1762-1769.
- Chen S., Yuan C., Clough D., Haddy F. y Pamnani M. Role of digitalis-like substance in experimental insulin-dependent diabetes mellitus hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; **22 (supl. 2)**: S20-S21.
- Cherry P. y Gillis C. Evidence for the role of endothelium-derived relaxing factor in acetylcholine-induced vasodilatation in the intact lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; **241**: 516-520.
- Christou H., Adatia I., Van Marter L., Kane J., Thompson J., Stark A., Wessel D. y Kourembanas S. Effect of inhaled nitric oxide on endothelin-1 and cyclic guanosine 5'-monophosphate plasma concentrations in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J. Pediatr.* 1997; **130**: 603-611.
- Clapp L. y Gurney A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels regulate resting potential pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1992; **262**: H916-H920.
- Coceani F., Kelsey L. y Seidlitz E. Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus arteriosus at birth. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992; **70**: 1061-1064.
- Coceani F. y Olley P. Eicosanoids in the fetal and transitional pulmonary circulation. *Chest* 1988; **93**: 112S-117S.
- Cocks T., King S. y Angus J. Glibenclamide is a competitive antagonist of the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in dog coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1990; **100**: 375-378.
- Cogolludo A., Pérez-Vizcaíno F. y Tamargo J. Antagonism by class I antiarrhythmic drugs of levromakalim-induced relaxation in isolated rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; **287**: 81-86.
- Cogolludo A., Pérez-Vizcaíno F., Fajardo S., Ibarra M. y Tamargo J. Effects of nicorandil as compared to mixtures of sodium nitroprusside and levromakalim in isolated rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1999; **126**: 1025-1033.
- Cohen R., Weisbrod R., Gericke M., Yaghoubi M., Bierl C. y Bolotina V. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of stores-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Circ. Res.* 1999; **84**: 210-219.
- Cook D. y Hales C. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic β-cells. *Nature* 1984; **311**: 271-273.

- Cook N., Weir S. y Danzeisen M. Antivasoconstrictor effects of the K<sup>+</sup> channel opener cromakalim on the rabbit aorta - comparison with the Ca<sup>2+</sup>-antagonist isradipine. *Br. J. Pharmacol.* 1988; **95**: 741-752.
- Cooke J., Rossitch E., Andon N., Loscalzo J. y Dzau V. Flow mediates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J. Clin. Invest.* 1991; **88**: 1663-1671.
- Cornfield D., Chatfield B., McQueston J., McMurtry I. y Abman S. Effects of birth-related stimuli of L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus. *Am. J. Physiol.* 1992; **262**: H1474-H1481.
- Cornfield D., Stevens T., McMurtry I., Abman S. y Rodman D. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth cells. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: L469-L475.
- Cornfield D., Reeve H., Tolarova S., Weir E. y Archer S. O<sub>2</sub> causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent sensitive potassium channel. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1996; **93**: 8089-8094.
- Crawley D., Liu S., Barnes P. y Evans T. Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. *J. Appl. Physiol.* 1992; **72**: 1425- 1431.
- Daly I. y Hebb C. Pulmonary vasomotor fibres in the cervical vagosympathetic nerve of dog. *Q. J. Exp. Physiol.* 1952; **37**: 19-43.
- Daly I. y Hebb C. Innervation of the lungs. En: *Pulmonar and Bronchial Vascular Systems*. Ed: I. Daly y C. Hebb. William and Wilkins, Baltimore. 1966: 89-117.
- Daly I., Ramsay D. y Waaler B. The site of action of nerves in the pulmonary vascular bed in dog. *J. Physiol.* 1970; **209**: 317-339.
- Dart C. y Standen N. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J. Physiol.* 1993; **471**: 767-786.
- Davidson D. y Heldemerdash A. Endothelium-derived relaxing factor: presence in pulmonary and systemic arteries of the newborn guinea pig. *Pediatr. Res.* 1990; **27**: 128-132.
- Davis M., Meninger G. y Zawieja D. Stretch-activated single channel and whole cell currents in vascular smooth muscles. *Am. J. Physiol.* 1992; **262**: C1083-C1088.
- Dinh-Xuan A., Higenbottan T., Clelland C., Pepke-Zaba J., Cremona G., Butt A., Large S., Wells F. y Wallwork J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N. Engl. J. Med.* 1991; **324**: 1539-1547.

- Dobyns E., Wescott J., Kennaugh J., Ross M. y Stenmark K. Eicosanoids decrease in newborns with persistent pulmonary hypertension successfully treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; **149**: 873-880.
- Druml W., Steltzer H., Waldhausl W., Lenz K., Hammerle A., Vierhapper H., Gasic S. y Wagner O. Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; **148**: 169-173.
- Duke H. The site of action of anoxia on the pulmonary blood vessels of the cat. *J. Physiol.* 1954; **125**: 373-382.
- Edwards G., Dora K., Gardener M. y Weston A.  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; **396**: 269-271.
- Edwards G. y Weston A. Structure-activity relationship of  $K^+$  channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; **11**: 417-422.
- Edwards G. y Weston A. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993; **33**: 597-637.
- Edwards G. y Weston A. Potassium channels in the regulation of vascular smooth muscle tone. En: *Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis. Biological, Therapeutical and Clinical Aspects.* Ed: T. Godfraind, G. Mancina, M. Abbrachio, L. Aguilar-Bryan y S. Goboni. Kluwer Academic Publishers, Londres, 1995: 85-93.
- Elliot F. y Reid L. Some new facts about the pulmonary artery and its branching pattern. *Clin. Radiol.* 1965; **16**: 193-198.
- Eltze M. Glibenclamide is a competitive antagonist of cromakalim, pinacidil, and RP49356 in guinea-pig pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; **165**: 231-239.
- Eronen M., Pohjavuori M., Andersson S., Pesonen E. y Raivio K. Prostacyclin treatment for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr. Cardiol.* 1997; **18**: 3-7.
- Evans A., Osipenko O., Haworth S. y Gurney A. Resting potentials and potassium currents during development of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1998; **275**: H887-H899.
- Ewart H. y Klip A. Hormonal regulation of the  $Na^+/K^+$ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 1995; **269**: C295-C311.
- Faraci F. y Heistad D. Role of ATPase-sensitive potassium channels in the basilar artery. *Am. J. Physiol.* 1993; **264**: H8-H13.

- Feleder E. y Adler-Graschinsky E. Endothelium-mediated and N<sup>ω</sup>-nitro-arginine methyl ester-sensitive responses to cromakalim and diazoxide in the rat mesenteric bed. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; **319**: 229-238.
- Ferrandi M., Minotti E., Salardi S., Florio M. Bianchi G. y Ferrari P. Characteristics of a ouabain-like factor from Milan hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; **22 (supl. 2)**: S75-S78.
- Ferro C. y Webb D. The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs* 1996; **51**: 12-27.
- Feschenko M. y Sweadner K. Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 30436-30444.
- Feschenko M. y Sweadner K. Structural basis for species. Specific differences in the phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 14072-14077.
- Fillenz M. Innervation of pulmonary and bronchial blood vessels of the dog. *J. Anat.* 1970; **106**: 449-461.
- Fineman J., Soifer S. y Heymann M. Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; **57**: 115-134.
- Flemming W. The electrogenic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump in smooth muscle: physiologic and pharmacologic relevance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1980; **20**: 129-149.
- François-Franck C. Étude critique et expérimentale de la vasoconstiction pulmonaire reflexe. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 1896; **18**: 193-198.
- Friedman S., Nakashima M. y Friedman C. Cell Na and K in the rat tail during the development of hypertension induced by deoxycorticosterone acetate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1975; **150**: 171-176.
- Frishman A. Respiratory gases in the regulation of the pulmonary circulation. *Physiol. Rev.* 1961; **41**: 214-280.
- Fritts J., Harris P., Clauss R., Odell J. y Cournand A. The effect of acetylcholine on human pulmonary circulation under normal and hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* 1958; **37**: 99-110.
- Frostell C., Fratacci M., Wain J., Jones R. y Zapol W. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; **83**: 2038-2047.

- Furchgott R. y Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**: 373-376.
- Gaine S. y Rubin L. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; **352**: 719-725.
- Ganitkevich V. e Isenberg G. Isolated guinea pig coronary smooth muscle cells: acetylcholine induces hyperpolarization due to sarcoplasmic reticulum calcium release activating potassium channels. *Circ. Res.* 1990; **67**: 525-528.
- García-Szabo R., Johnson A. y Malik A. Thromboxane increases pulmonary vascular resistance, transvascular fluid and protein exchange after pulmonary microembolism. *Prostaglandins* 1988; **35**: 707-721.
- Gardiner S., Kemp P. y Bennett T. Effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester on vasodilator responses to adrenaline or BRL 38227 in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **104**: 731-737.
- Garland C. y McPherson G. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1992; **105**: 429-435.
- Geggel R. y Reid L. The structural basis of PPHN. *Clin. Perinatol.* 1984; **11**: 525-549.
- Gelband C., Lodge N. y van Breemen C. A Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from rabbit aorta: Modulation by cromakalim. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; **167**: 201-210.
- George M. y Shibata E. Regulation of calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary artery myocytes. *J. Invest. Med.* 1995; **43**: 451-458.
- Gerber J., Voelkel N., Nies A., McMurtry I. y Reeves J. Moderation of hypoxic vasoconstriction by infused arachidonic acid: role of PGI<sub>2</sub>. *J. Appl. Physiol.* 1980; **49**: 107-112.
- Gessner P. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* 1995; **105**: 161-179.
- Ghione S., Balzan S., Decollogne S., Paci A., Pieraccini L. y Montali U. Endogenous digitalis-like activity in the newborn. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; **22** (supl. 2): S25-S28.
- Giaid A. y Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1995; **333**: 214-221.
- Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D., Michel R., Levy R., Shennib H., Kimura S.,

- Masaki T., Duguid W. y Stewart D. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1993; **328**: 1732-1739.
- Goldman A., Tasker R., Haworth S., Sigston P. y Macrae D. Four patterns of response to inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1996; **98**: 706-713.
- Gollasch H., Hescheler J. y Nelson M. Arterial vasorelaxation induced by Iloprost is prevented by blockers of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1991; **344**: R40.
- Gong M., Fuglsang A., Alessi D., Kobayashi S., Cohen P., Somlyo A. y Somlyo A. Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 1995; **486**: 113-122.
- Gopalakrishnan M., Johnson D., Janis R. y Triggle D. Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [<sup>3</sup>H]Glyburide, to neuronal and muscle preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; **257**: 1162-1171.
- Greene D., Lattimer S. y Sima A. Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium ATPase in the pathogenesis of diabetes complications. *N. Engl. J. Med.* 1987; **316**: 599-606.
- Grynkiewicz G., Ponie M. y Tsien R. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 3440-3450.
- Gryglewski R. The lung as a generator of prostacyclin. Ciba Found Symp. 78: 147. 1980.**
- Gupta S., Ruderman N., Cragoe E. y Sussman I. Endothelin stimulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by a protein kinase C-dependent pathway in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 1991; **261**: H38-H45.
- Haas F., Foster W. y Bergofski E. Direct effects of ouabain on the pulmonary vasculature and its enhancement of the vasoconstrictor response to hypoxia. *Prog. Respir. Res.* 1975; **9**: 273-284.
- Hall S. y Haworth S. Normal adaptation of pulmonary arterial intima to extrauterine life in the pig: ultrastructural studies. *J. Pathol.* 1986; **149**: 55-66.
- Hamilton T., Weir S. y Weston A. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 1986; **88**: 103-111.
- Hanson K., Abman S. y Clarke W. Elevation of pulmonary PDE5-specific activity in an experimental fetal pulmonary hypertension model. *Pediatr. Res.* 1996; **39**: 334A.

- Hasunuma K., Rodaman D., O'Brien R. y McMurtry I. Endothelin 1 causes pulmonary vasodilation in rats. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: H48-H54.
- Hauptert G., Carilli C. y Cantley L. Hypothalamic sodium-transport inhibitor is a high affinity reversible inhibitor of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Am. J. Physiol.* 1984; **247**: F919-F924.
- Haworth R., Goknur A. y Berkoff H. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels of adult rat heart cells by antiarrhythmic drugs. *Circ. Res.* 1989; **65**: 1157-1160.
- Haworth S. Pulmonary vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension. *Chest* 1988; **93**: 133S-138S.
- Haworth S. y Hislop A. Adaptation of the pulmonary circulation to extra-uterine life in the pig and its relevance to the human infant. *Cardiovasc. Res.* 1981; **15**: 108-119.
- Hay D., Luttmann M., Hubbard W. y Udem B. Endothelin receptor subtypes in human and guinea pig pulmonary tissues. *Br. J. Pharmacol.* 1993; **110**: 1175-1183.
- Haynes W. y Webb D. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease?. *Clin. Sci.* 1993; **84**: 485-500.
- Hendrickx H. y Casteels R. Electrogenic sodium pump in arterial smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 1974; **346**: 299-306.
- Herity N., Allen J., Silke B. y Adgey A. Assessment of the ability of levromakalim and sodium nitroprusside to reverse the cardiovascular effects of nitric oxide synthase inhibition in the anaesthetized pig. *Cardiovasc. Res.* 1994; **28**: 894-900.
- Hermesmeyer K. Electrogenic ion pumps and other determinants of membrane potential in vascular smooth muscle. *Federation Proc.* 1982; **42**: 246-252.
- Heymann M. Regulation of the pulmonary circulation in the perinatal period and in children. *Intensive Care Med.* 1989; **15**: S9-S15.
- Heymann M., LeBidois J., Soifer S. y Clyman R. Leukotriene synthesis inhibition increases pulmonary blood flow in fetal lambs. *Chest* 1988; **93**: 117S.
- Higenbottam T., Wells F., Wheeldon D., Wallwork J. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* 1984; **1**: 1046-1047.
- Himpens B., Kitazawa T. y Somlyo A. Agonist-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Arch* 1990; **417**: 21-28.

- Himpens B., Missiaen L. y Casteels R.  $Ca^{2+}$  homeostasis in vascular smooth muscle. *J. Vasc. Res.* 1995; **32**: 207-219.
- Hislop A. y Reid L. Intrapulmonary arterial development during fetal life: branching pattern and structure. *J. Anat.* 1972; **113**: 35-48.
- Hislop A. y Reid L. Formation of the pulmonary vasculature. En: *Development of the Lung*. Ed: H. Wa. Marcel Dekker, New York, 1977: 37-86.
- Hislop A., Zhao Y., Springall D., Polak J. y Haworth S. Postnatal changes in endothelin-1 binding in porcine pulmonary vessels and airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; **12**: 557-566.
- Hirata M., Kohse K., Chang C., Ikebe T. y Murad R. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 1268-1273.
- Holtzman M. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; **143**: 188-203.
- Hori M., Sato K., Miyamoto S., Ozaki H. y Karaki H. Different pathways of calcium sensitization activated by receptor agonists and phorbol esters in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1993; **110**: 1527-1531.
- Hori M., Sato K., Sakata K., Ozaki H., Takanao-Ohmuro H., Tsuchida T. Sugi H., Kato I. y Karaki H. Receptor agonists induce myosin phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent contractions in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; **261**: 506-512.
- Horisberger J., Lemas V., Krahenbühl J. y Rossier B. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 1991; **53**: 565-584.
- Horowitz A., Menice C., Laporte R. y Morgan K. Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 1996; **76**: 967-1003.
- Hosoda K., Nakao K. y Aray H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* 1991; **287**: 23-26.
- Hyman A. Neural regulation of pulmonary vascular bed. *Circulation* 1986; **74 (II)**: II-D-II-E.
- Hyman A. y Kadowitz P. Pulmonary vasodilator activity of prostacyclin ( $PGI_2$ ) in the cat. *Circ. Res.* 1979; **45**: 404-409.
- Ignarro L., Buga G., Wood K., Byrnes R. y Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing

factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987a; **84**: 9265-9269.

Ignarro L., Byrnes R., Buga G. y Wood K. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am. J. Physiol.* 1987b; **253**: H1074-H1082.

Ignarro L., Harbison R., Wood K. y Kadowitz P. Dissimilarities between methylene blue and cyanide on relaxation and cyclic GMP formation in endothelium-intact intrapulmonary artery caused by nitrogen oxide-containing vasodilators and acetylcholine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; **236**: 30-36.

Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* 1989; **94**: 363-386.

Inagaki N., Gono T., Clement J., Namba N., Inazawa J., González G., Aguilar-Bryan L., Seino S. y Bryan J. Reconstitution of  $IK_{ATP}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; **270**: 1166-1170.

Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kayusa Y., Miyauchi T., Goy K. y Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacological distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; **86**: 2863-2867.

Ito S., Kajikuri J., Itoh T. y Kuriyama H. Effects of lemakalim on changes in  $Ca^{2+}$  concentration and mechanical activity induced by noradrenaline in the rabbit mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **104**: 227-233.

Itoh H., Shimamura A., Okubo S., Ichikawa K., Ito M., Konishi T. y Nakano T. Inhibition of myosin light chain phosphatase during  $Ca^{2+}$ -independent vasocontraction. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: C1319-C1324.

Itoh Y., Furukawa K., Kajiwara M., Kitamura K., Suzuki H., Ito Y. y Kuriyama H. Effects of 2-nicotinamidoethyl nitrate on smooth muscle cells and on adrenergic transmission in the guinea-pig and porcine mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981; **218**: 260-270.

Ivy D., Kinsella J. y Abman S. Physiologic characterization of endothelin A and B receptor activity in the ovine fetal pulmonary circulation. *J. Clin. Invest.* 1994; **93**: 2141-2148.

Ivy D., Ziegler J., Dubus M., Fox J., Kinsella J. y Abman S. Chronic intrauterine pulmonary hypertension alters endothelin receptor activity in the ovine fetal lung. *Pediatr. Res.* 1996; **39**: 435-442.

Iwamoto J. y Morin F. Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. *J. Appl. Physiol.* 1993; **75**: 2332-2336.

Iwamoto T., Harada K., Nakajima F. y Sukamoto T. Effects of ouabain on muscle tension and intracellular  $Ca^{2+}$  level in guinea-pig aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; **224**: 71-76.

Jackson W. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H1797-H1803.

Janakidevi K., Fisher M., DelVecchio P., Tirupathi C., Figge J. y Malik A. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: C1295-C1303.

Ji J., Benishin C. y Pang P. Nitric oxide selectively inhibits intracellular  $Ca^{2+}$  release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; **285**: 16-21.

Kabins S., Fridman J., Kandelman M. y Weisberg H. Effects of sympathectomy on pulmonary embolism-induced lung edema. *Am. J. Physiol.* 1962; **202**: 687.

Kadowitz P. y Hyman A. Effect of sympathetic nerve stimulation on pulmonary vascular resistance in the dogs. *Circ. Res.* 1973; **32**: 221-227.

Kajioka S., Kitamura K. y Kuriyama H. Guanosine diphosphate activates an adenosine-5'-triphosphate-sensitive  $K^+$  channel in the rabbit portal vein. *J. Physiol.* 1991; **444**: 397-418.

Takei M., Noma A. y Shibasaki T. Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* 1985; **363**: 441-462.

Takei M. y Noma A. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *J. Physiol.* 1984; **352**: 265-284.

Karaki H., Sato K. y Ozaki H. Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic  $Ca^{2+}$ -tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1988a; **151**: 325-328.

Karaki H., Sato K., Ozaki H. y Murakami K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1988b; **159**: 259-266.

Karaki H., Sato K. y Ozaki H. Different effects of verapamil on cytosolic  $Ca^{2+}$  and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 1991; **55**: 35-42.

Karaki H. y Matsuda Y. RES-701-1: a novel endothelin  $ET_B$  receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.* 1996; **14**: 17-35.

Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K., Miyamoto S.,

- Nakazawa H., Won K. y Sato K. Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 1997; **49**: 157-230.
- Karashima T., Itoh T. y Kuriyama H. Effects of 2-nicotinamidoethyl nitrate on smooth muscle cells of the guinea-pig and rat portal veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; **221**: 472-480.
- Kawaguchi H., Sawa H. y Yasuda H. Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1990; **22**: 839-842.
- Kawakami K., Ohta T., Nojima H. y Nagano K. Primary structure of the  $\alpha$ -subunit of human Na,K-ATPase deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 1986; **100**: 389-397.
- Kawai N., Yamamoto T., Yamamoto H., McCarron R. y Spartz M. Endothelin 1 stimulates  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$  cotransport through  $\text{ET}_A$  receptors and protein kinase C-dependent pathway in cerebral capillary endothelium. *J. Neurochem.* 1995; **65**: 1588-1596.
- Kaye A., Nossaman B., Santiago J., De Witt B., Ibrahim I. y Kadowitz P. Differential effects of glibenclamide on responses to thromboxane  $\text{A}_2$  mimic, U46619, in the pulmonary and hindquarters vascular beds of the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; **340**: 187-193.
- Khan S., Higdon N. y Meisheri K. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: Involvement of plasmalemmal calcium-activated  $\text{K}^+$  channels and intracellular  $\text{Ca}^{++}$  stores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; **284**: 838-846.
- Kinsella J. y Abman S. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J. Pediatr.* 1995; **126**: 853-864.
- Kinsella J., Neish S., Ivi D., Shafer E. y Abman S. Clinical responses to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. *J. Pediatr.* 1993; **123**: 103-108.
- Kitazawa T., Lee M., Zhang M., Masuo M. y Li L. cGMP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  desensitization of contraction and myosin light chain phosphorylation in permeabilized smooth muscle. *Biophys. J.* 1996; **70**: A383.
- Kitazono T., Heistad D. y Faraci F. Role of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in CGRP-induced dilatation of basilar artery *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H581-H588.
- Kleppisch T. y Nelson M. ATP-sensitive  $\text{K}^+$  currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation. *Am. J. Physiol.* 1995; **269**: H1634-H1640.
- Knot H., Zimmermann P. y Nelson M. Extracellular  $\text{K}^+$ -induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier  $\text{K}^+$  channels. *J.*

*Physiol.* 1996; **429**: 419-430.

Konduri G. y Woodard L. Selective pulmonary vasodilation by low-dose infusion of adenosine triphosphate in newborn lambs. *J. Pediatr.* 1991; **119**: 94-102.

Kourembanas S., Marsden P., McQuilan L. y Faller D. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.* 1991; **88**: 1054-1057.

Kowaluk E., Seth P. y Fung H. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; **262**: 916-922.

Kreye V., Lenz T., Pfrunder D. y Theiss, U. Pharmacological characterization of nicorandil by  $^{86}\text{Rb}$  efflux and isometric vasorelaxation studies in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; **20**: S8-S12.

Kumar P., Kazzi N. y Shankaran S. Plasma immunoreactive endothelin-1 concentrations in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am. J. Perinatol.* 1996; **13**: 335-341.

Kuratomi Y., Lefferts P., Christan R., Parker R., Smith W., Mueller R. y Snapper J. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on endotoxin-induced pulmonary dysfunction in awake sheep. *J. Appl. Physiol.* 1993; **74**: 596-605.

Kuschinsky W., Wahl M., Bosse O. y Thurau K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. *Circ. Res.* 1972; **31**: 240-247.

LaDouceur D., Flynn M., Keiser J. Reynolds E. y Haleen S.  $\text{ET}_A$  y  $\text{ET}_B$  receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **196**: 209-215.

Leffler C., Hessler J. y Green R. Mechanisms of stimulation of pulmonary prostacyclin synthesis at birth. *Prostaglandins* 1984a; **28**: 877-887.

Leffler C., Hessler J. y Green R. The onset of breathing at birth stimulates pulmonary vascular prostacyclin synthesis. *Pediatr. Res.* 1984b; **18**: 938-942.

Levin E. Endothelins. *New Engl. J. Med.* 1995; **333**: 356-363.

Liben S., Stewart T., De Marte J. y Perreault T. Ontogeny of big-endothelin-1 effects in newborn piglet pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H139-H145.

Lippton H., Cohen G.A., McMurtry I.F. y Hyman A.L. Pulmonary vasodilation to endothelin isopeptides *in vivo* is mediated by potassium channel activation. *J. Appl. Physiol.* 1991; **70**: 947-952.

- Liu S., Crawley D., Evans T. y Barnes P. Endogenous nitric oxide modulates adrenergic neural vasoconstriction in guinea pig pulmonary *Br. J. Pharmacol.* 1991a; **104**: 565-569.
- Liu S., Crawley D., Barnes P. y Evans T. Endothelium-derived nitric oxide inhibits pulmonary vasoconstriction in isolated blood perfused rat lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991b; **143**: 32-37.
- Liu S., McCormack D., Evans T. y Barnes P. Endothelium-dependent non-adrenergic non-cholinergic neural relaxation in guinea pig pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992a; **260**: 541-548.
- Liu S., Hislop A., Haworth S.G. y Barnes P.J. Developmental changes in endothelium-dependent pulmonary vasodilation in pigs. *Br. J. Pharmacol.* 1992b; **106**: 324-330.
- Liu X., Hymel L. y Songu-Micze E. Role of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in stretch-induced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha$ -subunit regulation in aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1998; **274**: H83-H89.
- Lock J., Olley P., Coceani F., Swyer P., Rowe R. Use of prostacyclin in persistent fetal circulation. *Lancet* 1979; **1**: 1343.
- López-López J., González G., Urena J. y López-Barneo J. Low  $\text{PO}_2$  selectively inhibits  $\text{K}^+$  channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J. Gen. Physiol.* 1989; **93**: 1001-1015.
- Loutzenhiser R. y Parker M. Hypoxia and adenosine inhibit myogenic reactivity of renal afferent arterioles by a glyburide-sensitive mechanism. *J. Vasc. Res.* 1994; **31**: 30.
- Luby-Phelps K., Hori M., Phelps J. y Wong D.  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated dynamic compartmentalization of calmodulin in living smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 21532-21538.
- Lynch C., Wilson P., Balckmore P. y Exton J. The hormone-sensitive hepatic Na-pump: evidence for regulation by diacylglycerol and tumor promoters. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 14551-14556.
- Magargal W. y Overbeck H. Effect of hypertensive rat plasma on ion transport of cultured vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1986; **251**: H984-H990.
- Magliola L., McMahon E. y Jones A. Alterations in active Na-K transport during mineralocorticoid-salt hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.* 1986; **250**: C540-C546.
- Magnon M., Durand I. y Cavero I. The contribution of guanylate cyclase stimulation and  $\text{K}^+$  channel opening to nicorandil-induced vasorelaxation depends on the conduit vessel and on the nature of the spasmogen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; **268**: 1411-1418.

- Manchester D., Margolis H. y Sheldon R. Possible association between maternal indomethacin therapy and primary pulmonary hypertension of the newborn. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1976; **126**: 467-479.
- Marshall C. y Marshall B. Influence of perfusate PO<sub>2</sub> on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Circ. Res.* 1983; **52**: 691-696.
- Marshall J., Thomas T. y Turner L. A link between adenosine, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, potassium and muscle vasodilation in the rat in systemic hypoxia. *J. Physiol.* 1993; **472**: 1-9.
- Masuo M., Reardon S., Ikebe M. y Kitazawa T. A novel mechanism for the Ca<sup>2+</sup>-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. *J. Gen. Physiol.* 1994; **104**: 265-286.
- McCulloch A. y Randall M. Modulation of vasorelaxant responses to potassium channel openers by basal nitric oxide in the rat isolated superior mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 1996; **117**: 859-866.
- McDaniel N., Chen X., Singer H., Murphy R. y Rembold C. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: C461-C467.
- McMahon T., Hood J., Bellan J. y Kadowitz P. N<sup>o</sup> nitro-L-arginina methyl ester selectively inhibits pulmonary vasodilator responses to acetylcholine and bradykinin. *J. Appl. Physiol.* 1991; **71**: 2026-2031.
- Meisheri K., Cipkus-Dubray L., Hosner, J. y Khan S. Nicorandil-induced vasorelaxation: functional evidence for K<sup>+</sup> channel-dependent and cyclic GMP-dependent components in a single vascular preparation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; **17**: 903-912.
- Meisheri K., Khan S. y Martin J. Vascular pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: interactions between glyburide and K<sup>+</sup> channel openers. *J. Vasc. Res.* 1993; **30**: 2-12.
- Miller R., Pelton J. y Huggins J. Endothelins from receptors to medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993; **14**: 54-59.
- Miyauchi T., Yorikane R., Sakai S., Sakurai T., Okada M., Nishikibe M., Yano M., Yamaguchi I., Sugishita Y. y Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 1993; **73**: 887-897.
- Miyoshi Y. y Nakaya Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; **181**: 700-706.

Miyoshi Y., Nakaya Y., Wakatsuki T., Kakaya S., Fujino K., Saito K. e Inou I. Endothelin blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ. Res.* 1992; **70**: 612-616.

Montalescot G., Lowenstein E., Ogletree M., Greene E., Robinson D., Hartl K. y Zapol W. Thromboxane receptor blockade prevents pulmonary hypertension induced by heparin-protamine reactions in awake sheep. *Circulation* 1990; **82**: 1765-1777.

Montero A., Rodríguez-Barbero A., Ricote M., Sancho J. y López-Novoa J. Effect of ouabain and hypothalamic, hypophysary inhibitory factor on rat mesangial cell proliferation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; **22 (supl. 2)**: S32-S34.

Moore E., Etter E., Philipsony K., Carrington W., Forgy K., Lifshitz L. y Fay S. Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* 1993; **365**: 657-660.

Morecroft I. y McLean M. Developmental changes in endothelium-dependent vasodilation and the influence of superoxide anions in perinatal rabbit pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1998; **125**: 1585-1593.

Morin F. Hyperventilation, alkalosis, prostaglandins and the pulmonary circulation of the newborn. *J. Appl. Physiol.* 1986; **61**: 2088-2094.

Morin F., Egan E.A., Ferguson W. y Lundgren C.E. Development of pulmonary vascular response to oxygen. *Am. J. Physiol.* 1988; **254**: H542-H546.

Morin F. y Stenmark K. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; **151**: 2010-2032.

Morrison K. y Pollock D. Impairment of relaxations to acetylcholine and nitric oxide by a phorbol ester in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1990; **101**: 432-436.

Muller W., Kachel W., Lasch P., Varnholt V. y Konig S. Inhaled nitric oxide for avoidance of extracorporeal membrane oxygenation in the treatment of severe persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Intensive Care Med.* 1996; **22**: 71-76.

Murphy M. y Brayden J. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol.* 1995; **486**: 47-58.

Murray P., Lodato R. y Michael J. Neural antagonist modulate pulmonary vascular pressure-flow plots in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 1986; **60**: 1900-1907.

Nakhostine N. y Lamontagne D. Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilatation through ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H1289-H1293.

Narishige T., Egashira K., Akatsuka Y., Ymamura Y., Takahashi T., Kasuya H. y Takeshita A. Glibenclamide prevents coronary vasodilation induced by  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation in dogs. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: H84-H92.

Navran S., Adair S., Jemelka S., Seidel C. y Allen J. Sodium pump stimulation by activation of two adrenergic receptor subtypes in canine blood vessels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; **245**: 608-613.

Navran S., Allain G., García H., Allen J. y Seidel C. Serotonin-induced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump stimulation in vascular smooth muscle cells. Evidence for multiple receptor mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; **256**: 297-303.

Nelson M., Patlack J., Worley J. y Standen N. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: C3-C18.

Nelson M., Standen N., Brayden J. y Worley J. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1988; **336**: 382-385.

Noack T., Edwards G., Deitmer P., Greengrass P., Morita T., Anderson P., Criddle D., Wyllie M. y Weston A. The involvement of potassium channels in the action of ciclazindol in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 1992; **106**: 17-24.

Noma A. ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; **305**: 147-148.

Nomura Y., Asano M., Ito K., Uyama Y., Imaizumi Y. y Watanabe M. Potent vasoconstrictor actions of cyclopiazonic acid and thapsigargin on femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **120**: 65-73.

Noonan T. y Malik A. Pulmonary vascular response to leukotriene  $\text{D}_4$  in unanesthetized sheep: Role of thromboxane. *J. Appl. Physiol.* 1986; **60**: 765-769.

O'Donnell M. y Owen N. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1994; **74**: 683-721.

Ogawa Y., Nakao K., Arai H., Nakagawa O., Hosoda K., Suga S., Nakanishi S. y Imura H. Molecular cloning of non-peptide-selective human endothelin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; **178**: 248-255.

Ohya Y. y Speralakis N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1991; **68**: 763-771.

Oka M., Morris K., McMurtry I. NIP-121 is more effective than nifedipine in acutely reversing chronic pulmonary hypertension. *J. Appl. Physiol.* 1993; **75**: 1075-1080.

Okabe K., Kajioaka S., Nakao K., Kitamura K., Kuriyama H. y Weston A. Actions of cromakalim on ionic currents recorded from single smooth muscle cells of the rat portal vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; **252**: 832-839.

Okada Y., Yanagisawa T. y Taira N. BRL 38227 (levcromakalim)-induced hyperpolarization reduces the sensitivity of contractile elements in canine coronary artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1993; **347**: 438-444.

Omini C., Vigano T., Marini A., Pasargiklian R., Fano M. y Maselli M. Angiotensin II: a releaser of PGI<sub>2</sub> from fetal and newborn rabbit lungs. *Prostaglandins* 1983; **25**: 901.

Onizuka M., Miyauchi T., Morita R., Akaogi E., Mitsui K., Suzuki N., Fujino M., Yanagisawa M., Goto K., Masaki T. y Horii M. Increased plasma concentrations of endothelin-1 during and after pulmonary surgery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; **17**: S402-S403.

Oppenorth T., Wu Wong J. y Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB J.* 1992; **6**: 2653-2659.

O'Rourke S. K<sub>ATP</sub> channel activation mediates nicorandil-induced relaxation of nitrate-tolerant coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996; **27**: 831-837.

Ortiz J., Labat T., Norel X., Gorenne I., Verley J. y Brink C. Histamine receptors on human isolated pulmonary arterial muscle preparations: effects of endothelial cell removal and nitric oxide inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; **260**: 762-767.

Pace J. Sympathetic control of pulmonary vascular impedance in anesthetized dogs. *Circ. Res.* 1971; **29**: 555-568.

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

Parker T., Ivy D., Kinsella J., Torielli F., Ruyle S., Thilo E. y Abman S. Combined therapy with inhaled nitric oxide and intravenous prostacyclin in an infant with alveolar-capillary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; **155**: 743-746.

Peacock A., Dawes K., Shock A., Gray A., Reeves J. y Laurent G. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary fibroblasts. *Am. J. Resp. Cell Moll. Biol.* 1992; **7**: 492-499.

Pérez-Vizcaíno F., Fernández C., Fernández del Pozo B., Cogolludo A., Zaragoza F. y Tamargo J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of disopyramide in isolated rat vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; **32**: 745-752.

Pérez-Vizcaíno F., Villamor E., Duarte J. y Tamargo J. Involvement of protein kinase C in reduced relaxant responses to the NO/cGMP pathway in piglet pulmonary arteries contracted by the thromboxane A<sub>2</sub> mimetic U46619. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **121**: 1323-1333.

Pérez-Vizcaíno F., Villamor E., Moro M. y Tamargo J. Pulmonary versus systemic effects of vasodilator drugs. An in vitro study in isolated intrapulmonary and mesenteric arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; **314**: 91-98.

Perreault T. y Baribeau J. Characterization of endothelin receptors in newborn piglet lung. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: L607-L614.

Perreault T. y De Marte J. Endothelin-1 has a dilator effect on neonatal pig pulmonary vasculature. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; **18**: 43-50.

Perreault T., Coe J., Olley P. y Coceani F. Pulmonary vascular effects of prostaglandin D<sub>2</sub> in newborn pig. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H1292-H1299.

Pinheiro J. y Malik A. K<sub>ATP</sub> channel activation causes marked vasodilation in the hypertensive neonatal pig lungs. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: H1532-H1536.

Plane F. y Garland C. Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *Br. J. Pharmacol.* 1993; **110**: 651-656.

Plane F., Wiley K., Jeremy J., Cohen R. y Garland C. Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.* 1998; **123**: 1351-1358.

Ponte A., Marín J., Arribas S., González R., Barrús T., Salaíces M. y Sánchez-Ferrer C. Endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in aortas of normotensive wistar-kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc. Res.* 1996; **33**: 164-174.

Poole T. y Coffin J. Vasculogénesis and angiogénesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J. Exp. Zool.* 1989; **251**: 224-231.

Post J., Hume J., Archer S. y Weir K. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 1992; **262**: C882-C890.

Quayle J., Nelson M. y Standen N. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1997; **77**: 1165-1232.

Quast U. Potassium channel openers: Pharmacological and clinical aspects. *Fundam. Clin Pharmacol.* 1992; **6**: 279-293.

- Quast U. Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels?. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993; **14**: 332-337.
- Quast U. y Cook N. Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 1989; **10**: 431-435.
- Quast U., Guillon J. y Cavero I. Modulation of K<sup>+</sup> channels: pharmacological and therapeutic aspects. En: Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis. Biological, Therapeutical and Clinical Aspects. Ed: T. Godfraind, G. Mancia, M. Abbrachio, L. Aguilar-Bryan y S. Goboni. Kluwer Academic Publishers, Londres, 1995: 23-43.
- Rabinovitch M. Structure and function of the pulmonary vascular bed: an update. *Cardiol. Clin.* 1989; **7**: 895-914.
- Rabinovitch M. Developmental biology of the pulmonary vascular bed. En: Neonatal Heart Disease. Ed: R. Freedom, L. Benson y J. Smallhorn. Springer-Verlag, Londres. 1992: 45-64.
- Randall M. y McCulloch A. The involvement of ATP-sensitive potassium channels in  $\beta$ -adrenoceptor-mediated vasorelaxation in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 1995; **115**: 607-612.
- Randall M., Alexander S., Bennett T., Boyd E., Fry J., Gardiner S., Kemp P., McCulloch A. y Kendall SD. An endogenous cannabinoid as an endothelium derived vasorelaxant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **229**: 114-120.
- Rapoport R., Schwartz K. y Murad F. Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ. Res.* 1985; **57**: 164-170.
- Rashatwar S., Cornwell T. y Lincoln T. Effects of 8-bromo-cGMP on Ca<sup>2+</sup> levels in vascular smooth muscle cells: Possible regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 5685-5689.
- Redding G., McMurtry y Reeves J. Effects of meclofenamate on pulmonary vascular resistance correlate with postnatal age in young piglets. *Pediatr. Res.* 1984; **18**: 579-583.
- Redondo J., Peiró C., Rodríguez-Mañas L., Salaíces M., Marín J. y Sánchez-Ferrer C. Endothelial stimulation of Na/K pump in cultured vascular smooth muscle. *Hypertension* 1995; **26**: 177-185.
- Redondo J., Rodríguez-Martínez A., Alonso M., Salaíces M., Balfagón G. y Marín J. Endothelium stimulates the vascular smooth muscle cell Na/K pump of normotensive and hypertensive rats by protein kinase C pathway. *J. Hypertension* 1996; **14**: 1301-1307.

- Reid D. y Thornburg K. Pulmonary pressure-flow relationships in the fetal lamb during in utero ventilation. *J. Appl. Physiol.* 1990; **69**: 1630-1636.
- Reid L. The control of cellular proliferation in the pulmonary circulation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; **140**: 1490-1493.
- Rembold C. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* 1992; **20**: 129-137.
- Rengasamy A. y Johns R. Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; **259**: 310-316.
- Reuss M. y Rudolph A. Distribution and recirculation of umbilical and systemic venous blood flow in fetal lambs during hypoxia. *J. Dev. Physiol.* 1980; **2**: 71-84.
- Rimar S. y Gillis N. Pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide after endothelial injury. *J. Appl. Physiol.* 1992; **73**: 2179-2183.
- Risau W., Sariola H., Zerwes H., Sasse J., Eklom P., Kemler R. y Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988; **102**: 471-478.
- Roberts J., Polaner D., Lang P. y Zapol W. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**: 818-819.
- Robertson B., Schubert R., Hescheler J. y Nelson M. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: C299-C303.
- Robertson T., Aaronson P. y Ward J. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca<sup>2+</sup> sensitization. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: H301-H307.
- Rodman D. Chronic hypoxia selectively augments rat pulmonary artery Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel-mediated relaxation. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: L88-L94.
- Rosenberg A., Kennaugh J., Koppenhahafere S., Loomis M., Chatfield B. y Abman S. Elevated immunoreactive endothelin-1 levels in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J. Pediatr.* 1993; **123**: 109-116.
- Rubanyi G. y Polokoff M. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 1994; **46**: 325-415.

- Rubanyi G., Romero J. y Vanhoutte P. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1986; **250**: H1145-H1149.
- Rudolph A. Fetal and neonatal pulmonary circulation. *Annu. Rev. Physiol.* 1979; **41**: 383-395.
- Rudolph A. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ. Res.* 1985; **57**: 811-821.
- Rudolph A. y Yuan S. Response to the pulmonary vasculature to hypoxia and H<sup>+</sup> ion concentration changes. *J. Clin. Invest.* 1966; **45**: 399-411.
- Ruiz-Velasco V., Zhong J., Hume J. y Keef K. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.* 1998; **82**: 557-565.
- Runkle B., Goldberg R., Streitfeld M., Clark M., Buron E., Setzer E. y Bancalari E. Cardiovascular changes in group B streptococcal sepsis in the piglet: Responses to indomethacin and relationship to prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub>. *Pediatr. Res.* 1984; **18**: 874-878.
- Rush N. y Stekiel W. Ionic channels of vascular smooth muscle in hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991; **308**: 1-7.
- Sabin F. Origin and development of primitive vessels of the chick and of the pig. *Carnegie Contrib. Embryol.* 1917; **6**: 61-124.
- Sada K., Shirai M. y Ninomiya I. Vagally and acetylcholine-mediated constriction in small pulmonary vessels of rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1987; **63**: 1601-1609.
- Sakai S., Miyauchi T., Sakurai T., Yamaguchi I., Kobayashi M., Goto K. y Sugishita Y. Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and endothelin-1-like immunoreactivity in the lung in congestive heart failure in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; **28**: 1580-1588.
- Sakurai T., Yanagisawa M., Takawa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K. y Masaki T. Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; **348**: 732-735.
- Sakuta H., Okamoto K. y Watanabe Y. Blockade by antiarrhythmic drugs of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1992a; **107**: 1061-1067.
- Sakuta H., Sekiguchi M., Okamoto K. y Sakai Y. Inactivation of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels in *Xenopus* oocytes by various calmodulin antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 1992b;

226: 199-207.

Salomone S., Morel N. y Godfraind T. Effects of 8-bromo cyclic GMP and verapamil on depolarization-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal contraction in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1995; **114**: 1731-1737.

Sánchez-Luna M., Elorza M., Álvarez I., Pérez-Rodríguez J. y Quero J. Experimental models of neonatal persistent pulmonary hypertension. Results and clinically relevant deductions. En: *Physiologic Basis of Perinatal Care*. Ed: J. Medina y J. Quero. Ergon, 1993: 395-398.

Sato K., Ozaki H. y Karaki H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; **246**: 294-300.

Sato K., Hori M., Ozaki H., Takanao-Ohmuro H., Tsuchida T., Sugi H., y Karaki H. Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; **261**: 497-505.

Satoh T., Cohen H. y Katz A. Intracellular signalling in the regulation of renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  II: Role of eicosanoids. *J. Clin. Invest.* 1993; **91**: 409-415.

Schwanstecher M., Brandt C., Behrends S., Schaupp U. y Paten U. Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic beta-cell line and rat cerebral cortex. *Br. J. Pharmacol.* 1992; **106**: 295-301.

Schwartzman M., Ferreri N., Carrol E., Songu-Mize E. y McGiff J. Renal cytochrome P450-related arachidonate metabolite inhibits Na-K ATPase. *Nature* 1985; **314**: 620-622.

Shaul P., Campbell W., Farrar M. y Magness R. Oxygen modulates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary arteries by an effect on cyclooxygenase. *J. Clin. Invest.* 1992; **90**: 2147-2155.

Shaul P., Farrar M. y Magness R. Pulmonary endothelial nitric oxide production is developmentally regulated in the fetus and newborn. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H1056-H1063.

Shen W., Tung R., Machulda M. y Kurachi Y. Essential role of nucleotide diphosphates in nicorandil-mediated activation of cardiac ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel. A comparison with pinacidil and lemakalim. *Circ. Res.* 1991; **69**: 1152-1158.

Shinbo A. y Iijima T. Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  current induced by  $\text{K}^+$  channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **120**: 1568-1574.

Siegel G., Emden J., Wenzel K., Mironneau J. y Stock G. Potassium channel activation in

vascular smooth muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; **311**: 53-72.

Silberberg S. y van Breemen C. A potassium current activated by lemakalim and metabolic inhibition in rabbit mesenteric artery. *Pflügers Arch.* 1992; **420**: 118-120.

Skou J. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerve. *Biochim. Biophys. Acta* 1957; **23**: 394-401.

Smirnov S., Robertson T., Ward J. y Aaronson P. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat pulmonary artery smooth cells. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: H365-H370.

Soifer S., Morin F., Kaslow D. y Heymann M. The developmental effects of PGD<sub>2</sub> on the pulmonary and systemic circulations in the newborn lamb. *J. Dev. Physiol.* 1983; **5**: 237.

Soifer S., Schreiber M. y Heymann M. Leukotriene antagonists attenuate tromboxane-inducible pulmonary hypertension. *Pediatr. Res.* 1989; **26**: 83-87.

Somlyo A. y Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 1989; **5**: 2593-2599.

Somlyo A.P., Kitazawa T., Kobayashi S., Gong M. y Somlyo A.V. Pharmacological coupling: The membrane talk to the cross-bridges. En: *Regulation Of Smooth Muscle Contraction*. Ed: R. Moreland. Plenum Press, New York. 1991: 185-206.

Spruce A., Standen N.B. y Stanfield P. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985; **316**: 736-738.

Stamler J., Loh E., Roddy M., Currie K. y Creager M. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; **89**: 2035-2040.

Standen N., Quayle J., Davies N., Brayden J., Huang Y. y Nelson M. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989; **245**: 177-180.

Steinhorn R., Russel J. y Morin F. Disruption of cyclic GMP production in pulmonary arteries isolated from fetal lambs with pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: H1483-H1489.

Strugess N., Kozlowski R., Carrington C., Hales C. y Ashford M. Effects of sulphonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide-sensitive channels in an insulin secreting cell line. *Br. J. Pharmacol.* 1988; **95**: 83-94.

Struijker-Boudier H, Messing M. y Van-Essen H. Preferential small arteriolar vasodilatation

by the potassium channel opener, BRL 38227 in conscious spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; **18**: 191-193.

Sudjarwo S., Hory M., Takai M., Urade Y., Okada T. y Karaki H. A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.* 1993; **533**: 431-437.

Sudjarwo S., Hory M., Tanaka T., Matsuda Y., Okada T. y Karaki H. Coupling of the endothelin ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> receptors to calcium mobilization and calcium sensitization in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; **289**: 197-204.

Sumner M., Cannon T., Mundin J., White D. y Watts L. Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* 1992; **107**: 858-860.

Taguchi H., Heistad D., Kitazono T. y Faraci F. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. *Circ. Res.* 1994; **74**: 1005-1008.

Takano M. y Noma A. Selective modulation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by nicorandil in guinea-pig cardiac cell membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1990; **342**: 592-597.

Tallarida R., Porreca F. y Cowan A. Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sci.* 1989; **45**: 947-961.

Tamaoki J., Tagaya E., Nishimura K., Isono K. y Nagai A. Role of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **122**: 112-116.

Tamaoki J., Tagaya E., Yanawaki I. y Konno K. Hypoxia impairs nitrovasodilator-induced pulmonary vasodilation: role of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Am. J. Physiol.* 1996; **271**: L172-L177.

Tansey M., Word R., Hidaka H., Singer H., Schworer C., Kamm K. y Stull J. Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 12511-12516.

Teitel D., Isawoto H. y Rudolph A. Effects of birth-related events on central blood flow patterns. *Pediatr. Res.* 1987; **22**: 557-566.

Teitel D., Isawoto H. y Rudolph A. Changes in the pulmonary circulation during birth-related events. *Pediatr. Res.* 1990; **27**: 372-378.

The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N. Engl. J. Med.* 1997; **336**: 597-604.

- The Inhaled Nitric Oxide Study Group. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N. Engl. J. Med.* 1997; **336**: 605-610.
- Thuringer D. y Escande D. Apparent competition between ATP and the potassium channel opener RP49356 on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels of cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 1989; **36**: 897-902.
- Tiktinski M. y Morin F. Increased oxygen tension dilates fetal pulmonary circulation via endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H376-H380.
- Toga H., Usha Raj P., Hillyard R., Ku B. y Anderson J. Endothelin effects in isolated perfused lamb lungs: role of cyclooxygenase inhibition and vasomotor tone. *Am. J. Physiol.* 1991; **261**: H443-H450.
- Tosun M., Paul R. y Rapoport R. Coupling of store-operated Ca<sup>++</sup> entry to contraction in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; **285**: 759-766.
- Tristani-Firouzi M., Martin E., Tolarova S., Weir E., Archer S. y Cornfield D. Ventilation-induced pulmonary vasodilation at birth is modulated by potassium channel activity. *Am J. Physiol.* 1996; **271**: H2353-H2359.
- Truog W., Sorensen G., Standaert T. y Redding G. Effects of the thromboxane synthase inhibitor, dazmegrel (UK 38,485) on pulmonary gas exchange and hemodynamics in neonatal sepsis. *Pediatr. Res.* 1986; **20**: 481-486.
- Tulloh R., Hislop A., Boels P., Deutsch J., Haworth S. Chronic hypoxia inhibits postnatal maturation of porcine intrapulmonary artery relaxation. *Am. J. Physiol.* 1997; **272**: H2436-H2445.
- Van Breemen C., Chen Q. y Laher I. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; **16**: 98-105.
- Vasilets L. y Schwarz W. Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; **1154**: 210-222.
- Villamor E., Le Cras T., Horan M., Halbower A., Tuder R y Abman S. Chronic intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelial nitric oxide synthase in the ovine fetus. *Am. J. Physiol.* 1997a; **272**: L1013-L1020.
- Villamor E., Ruiz T., Pérez-Vizcaíno F., Tamargo J. y Moro M. Endothelium-derived nitric oxide-dependent response to hypoxia in piglet intrapulmonary arteries. *Biol. Neonate* 1997b; **72**: 62-70.
- Wadsworth R. Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends Pharmacol. Sci.*

1994; **15**: 47-53.

Wakatsuki T., Nakaya Y. e Inoue I. Vasopressin modulates K<sup>+</sup> channels activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: H491-H496.

Walsh M. Regulation of vascular smooth muscle. *Can. J. Physiol.* 1993; **72**: 919-936.

Walsh-Sukys M. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. The black box revisited. *Clin. Perinatol.* 1993; **20**: 127-143.

Wang J., Juhaszova M., Rubin L. y Yuan X. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1997; **100**: 2347-2353.

Wang Y. y Coceani F. Isolated pulmonary resistance vessels from fetal lambs. Contractile behaviour and responses to indomethacin and endothelin-1. *Circ. Res.* 1992; **71**: 320-330.

Wang Y., Coe Y., Toyoda O. y Coceani F. Involvement of endothelin-1 in hypoxic pulmonary vasoconstriction in the lamb. *J. Physiol.* 1995; **482**: 421-434.

Wanstall J. The pulmonary vasodilator properties of potassium channel opening drugs. *Gen. Pharmacol.* 1996; **27**: 599-605.

Ward J., Chappell L. y Leach R. Effects of BRL38227 and glibenclamide on small pulmonary arteries of the rat. En: Resistance Arteries: Structure and Function. Ed: M. Mulvany, C. Alkjaer, A. Heagerty, N. Nyborg y S. Strandgaard. Excerpta Medica International Congress Series, 1991: 139-143.

de Wardener H. Franz Volhard Lecture 1996. Sodium transport inhibitors and hypertension. *J. Hypertens.* 1996; **14**: S9-18.

Webb D. Endothelin: from molecule to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1997; **44**: 9-20.

Webb R. y Bohr D. Potassium-induced relaxation as an indicator of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 1978; **15**: 198-207.

Webb R. y Bohr D. Relaxation of vascular smooth muscle by isoproterenol, dibutyryl-cyclic AMP and teophylline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981; **217**: 26-35.

Weitzberg E., Hemsén A., Rudehill A., Modin A., Wanececk M. y Lundberg J. Bosentan-improved cardiopulmonary vascular performance and increased plasma levels of endothelin-1 in porcine endotoxin shock. *Br. J. Pharmacol.* 1996; **118**: 617-626.

Weitzberg E., Lundberg J. y Rudehill A. Inhibitory effects of diclofenac on the endotoxin

- shock response in relation to endothelin turnover in the pig. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1995; **39**: 50-59.
- Wheeler A., Hardie W. y Bernard G. The role of cyclooxygenase products in lung injury induced by tumor necrosis factor in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; **145**: 632-639.
- White R. y Hiley C. Modulation of relaxation to levcromakalim by S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) and 8-bromo cyclic GMP in the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1998a; **124**: 1219-1226.
- White R. y Hiley C. Effects of K<sup>+</sup> channel openers on relaxations to nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* 1998b **357**: 41-51.
- Wiener C., Dunn A. y Sylvester J. ATP-dependent K<sup>+</sup> channels modulate vasoconstrictor responses to severe hypoxia in isolated ferret lungs. *J. Clin. Invest.* 1991; **88**: 500-504.
- Wong J., Fineman J., y Heymann M. The role of endothelin and endothelin receptor subtypes in regulation of fetal pulmonary vascular tone. *Pediatr. Res.* 1994; **35**: 664-670.
- Wong J., Vanderford P., Fineman J., Chang R. y Soifer S. Endothelin-1 produces pulmonary vasodilation in the intact newborn lamb. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H1318-H1325.
- Xia P., Kramer R. y King G. Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Clin. Invest.* 1995; **96**: 733-740.
- Xu D., Emoto N. y Giaid A. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; **78**: 473-485.
- Yamagishi T., Yanagisawa y Taira N. K<sup>+</sup> channel openers, cromakalim and Ki4032, inhibit agonist-induced Ca<sup>2+</sup> release in canine coronary artery. *Naunyn-Schniedeberg's Arch. Pharmacol.* 1992; **346**: 691-700.
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K. y Masaki T. A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**: 411-415.
- Yang Z., Richard V., Von Segesser L., Bauer E., Stulz P., Turina M. y Luscher T. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries: a new mechanism of vasospasm?. *Circulation* 1990; **82**: 188-195.
- Yuan X., Tod M., Rubin L y Blaustein M. NO hyperpolarizes smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by activating voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93**: 10489-10494.

Yuan X., Wang J., Juhaszova M., Gaine S. y Rubin L. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; **351**: 726-727.

Zamora C., Baron D. y Heffner J. Thromboxane contributes to pulmonary hypertension in ischemia-reperfusion lung injury. *J. Appl. Physiol.* 1993; **74**: 224-229.

Zellers T. y Vanhoutte P. Endothelium-dependent relaxations of piglet pulmonary arteries augment with maturation. *Pediatr. Res.* 1991; **30**: 176-180.

Zetter B. Angiogenesis. *Chest* 1988; **93**: 159S-166S.

Zhang L., Bonev A., Mawe G. y Nelson M.T. Protein kinase A mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents by CGRP in gallbladder smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1994; **267**: G494-G499.

Zhao Y., Wang J. Rubin L. y Yuan X. Inhibition of K<sub>v</sub> and K<sub>Ca</sub> channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* 1997; **272**: H904-H912.

Zhu Z., Neusser M., Tepel M., Spieker C., Golinski P. y Zidek W. Effect of Na,K-ATPase inhibition on cytosolic free calcium ions in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J. Hypertension* 1994; **12**: 1007-1012.