

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

EFFECTOS DE LA TIROXINA Y LA TRIYODOTIRONINA EN
LA VENA SAFENA HUMANA

MARCOS GUAITA MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 d'
Octubre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Salvador Lluch López
- D. Guillermo Sáez Tormo
- D. José Vila Salinas
- D. Luis Monge Sánchez
- D^a. Núria Fernández Monsalve

Va ser dirigida per:

D. Pascual Medina

D^a. Gloria Segarra

D. Salvador Donderis

©Copyright: Servei de Publicacions
Marcos Guaita Martínez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6467-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**EFFECTOS DE LA TIROXINA Y LA TRIYODOTIRONINA
EN LA VENA SAFENA HUMANA**

Tesis Doctoral presentada por:

Marcos Guaita Martínez

para optar al Grado de Doctor en Medicina

Valencia, Julio de 2005

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Sanidad, Ministerio de Ciencia y Tecnología y la Generalitat Valenciana.

D. PASCUAL MEDINA BESSÓ, Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia, D^a GLORIA SEGARRA IRLES, Investigadora del Sistema Nacional de Salud y D. SALVADOR DONDERIS TORRENS, Jefe del Servicio de Análisis Clínicos del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICAN: Que MARCOS GUAITA MARTÍNEZ ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado **EFFECTOS DE LA TIROXINA Y LA TRIYODOTIRONINA EN LA VENA SAFENA HUMANA** para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos firman la presente en Valencia a 8 de julio de 2005.

Fdo. :
Dr. Pascual Medina

Fdo. :
Dra. Gloria Segarra

Fdo. :
Dr. Salvador Donderis

Deseo expresar mi agradecimiento a todo el equipo de investigación porque trabajar con ellos durante todos estos años ha sido un auténtico placer.

Al Dr. Salvador Lluch, Catedrático de Fisiología, por brindarme la oportunidad de entrar a formar parte de este equipo de investigación, por haberme iniciado en este apasionante campo y por su constante interés y dedicación en la realización de este trabajo.

Al Dr. Pascual Medina, director de este trabajo, por haberme ayudado desde el primer momento que entré a formar parte del equipo, ya que sin su dedicación, ayuda, consejos e infinita paciencia, nunca hubiese podido realizar esta tesis.

A la Dra. Gloria Segarra, directora de este trabajo por su valiosa ayuda, tanto durante los experimentos como aclarando las dudas surgidas durante todos estos años.

Al Dr. José Vila, por su apoyo incondicional, por haber estado siempre que lo he necesitado, sacando tiempo de donde no lo había y animarme en los momentos más difíciles. Gracias por demostrar que además de un excelente compañero, es un gran amigo.

Al Dr. Martín Aldasoro, por ofrecerme su ayuda y su amistad.

A todas mis compañeras de departamento, Eva, Belén Cortina Belén Torondel, Marta y Mariola, agradecerles su ayuda y los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Guillermo Sáez, por sus valiosos consejos y por su ayuda tanto dentro como fuera de la Facultad, por haber demostrado que además de un gran profesor e investigador es un buen amigo.

Al Dr. Salvador Donderis, director de este trabajo, por ser la persona que más me ha ayudado durante estos años. Gracias por su amistad, por estar disponible siempre que he necesitado su ayuda o consejo y sobre todo agradecerle que sea mi maestro además de un gran amigo.

A mis padres y a mi hermana Rebeca, por haber confiado siempre en mí y haberme animado en los momentos difíciles durante todos estos años, tanto durante la carrera como durante el desarrollo de este trabajo. Sin vosotros no hubiera podido hacerlo.

A mis abuelos, en especial a mi abuelo Miguel, a los que echo mucho de menos, sobre todo en momentos como este.

Y por último quiero dedicar esta tesis a Natalia, por su comprensión y paciencia sin límites, por su ánimo continuo, por ser como es y estar siempre a mi lado, porque sin ella nunca hubiera podido hacerlo.

Introducción	1
Vena safena interna.....	2
Aspectos morfológicos y estructurales	2
Usos clínicos de la vena safena	5
Regulación del tono vascular.....	7
Papel modulador del endotelio	7
Hormonas tiroideas.....	15
Síntesis.....	15
Mecanismo de acción.....	17
Papel de las hormonas tiroideas en la función cardiovascular	18
Hipótesis	22
Objetivos	23
Material y métodos	25
Material biológico	26
Procedimiento experimental	26
Preparación de los segmentos vasculares	26
Tensión isométrica	27
Determinación de la tensión pasiva óptima	28
Determinación de la capacidad contráctil	31
Curvas concentración-respuesta.....	33
Participación del endotelio en la respuesta relajante a la T ₃ y T ₄ ..	33
Efecto de la inhibición de la Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa y de los canales de K ⁺ rectificadores de entrada en la respuesta a la T ₃ ..	35
Efecto de la T ₃ sobre la relajación inducida por el nitroprusiato sódico.....	35
Efecto de la T ₃ sobre los niveles de AMPc y GMPc.....	36
Determinación de los niveles de AMPc y GMPc.....	38
Fármacos.....	39
Cálculos estadísticos.....	40

Resultados	41
Efectos relajantes de la T ₃ y la T ₄	42
Participación de la guanilato ciclasa y de la adenilato ciclasa en la respuesta a la T ₃	42
Participación de las sustancias prostanoides y del óxido nítrico en la respuesta a la T ₃	54
Participación de los canales de K ⁺ y la Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa en la respuesta a la T ₃	59
Respuesta al nitroprusiato sódico	63
Discusión	68
Consideraciones finales	78
Conclusiones	82
Bibliografía	84

INTRODUCCIÓN

El bajo rendimiento cardíaco es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes a los que se les realiza una operación cardíaca, especialmente a los de edad avanzada y aquellos con insuficiencia ventricular. Se ha demostrado que la concentración plasmática de 3,3',5-triyodo-L-tironina (T_3) en pacientes a los que se les realiza un bypass coronario disminuye,¹ existiendo similitudes clínicas con pacientes hipotiroideos, como son el descenso de la contractilidad cardíaca y elevación de las resistencias vasculares periféricas.² Hay estudios que sugieren que la administración de T_3 en el periodo perioperatorio, podría mejorar la evolución de estos pacientes. Sin embargo, los efectos y el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas en la vena safena humana, vaso utilizado en el bypass coronario, no son conocidos, lo que nos lleva a plantear la realización del presente estudio.

Vena safena interna

Aspectos morfológicos y estructurales

La vena safena interna se origina a partir del extremo interno del arco venoso dorsal del pie y, junto a la rama tibial del nervio safeno interno, asciende verticalmente pasando por delante del maléolo medial a lo largo del borde interno de la tibia (*Figura 1*). A continuación, pasa por detrás del cóndilo interno del fémur, rodeándolo

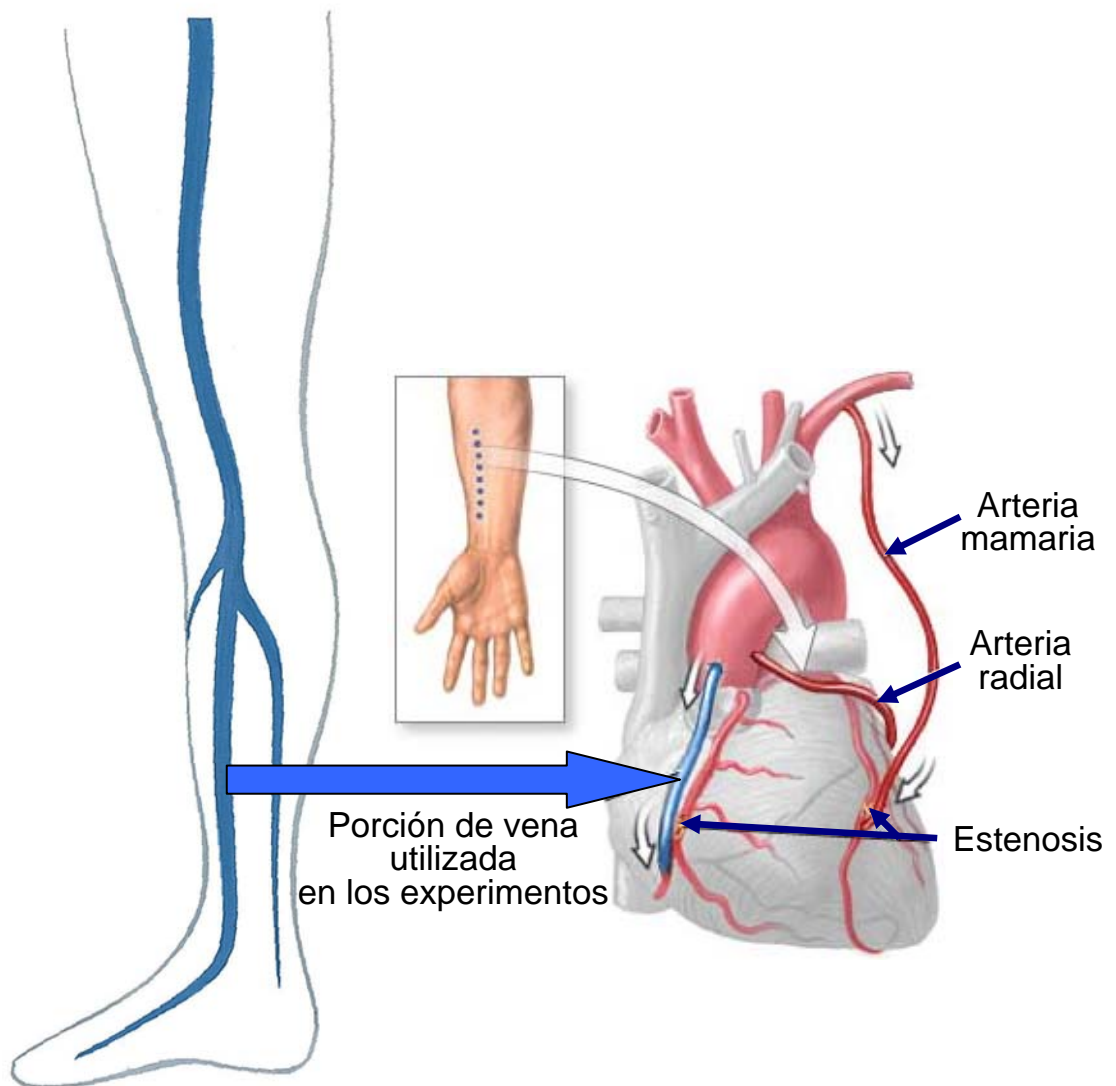


Figura 1. Representación esquemática del trayecto de la vena safena interna y de los vasos utilizados como injertos en la cirugía del bypass coronario.

para ascender por la cara anterointerna del muslo en un trayecto paralelo al borde interno del músculo sartorio, esta vez acompañada por la rama anterior del nervio musculocutáneo interno y por la rama accesoria del nervio safeno interno. Una vez alcanza el triángulo anatómico de Scarpa, se desvía y atraviesa la fascia cribiforme tres o cuatro centímetros por debajo del ligamento inguinal, describiendo un arco o gancho de concavidad inferior conocido como cayado de la safena interna, para desembocar en la cara anterointerna de la vena femoral común.

A diferencia de las arterias, las capas constitutivas de la pared venosa no se encuentran bien definidas, y su estructura varía considerablemente según la localización y tipo de vena. En las venas de cierto calibre, la pared consta de tres capas o tunicas.³ *Túnica interna o íntima*, constituida por un revestimiento endotelial, *Túnica media*, formada por fibras musculares lisas y fibras elásticas incluidas en tejido conjuntivo y la *Túnica externa o adventicia*, formada por tejido conjuntivo, fibroblastos y fibras elásticas; además contiene elementos vasculares, linfáticos y nerviosos que garantizan el adecuado trofismo de la pared vascular.

El componente muscular está particularmente bien desarrollado en las venas de las extremidades inferiores, sobre todo en las venas safenas, de forma que hasta el 80% de la masa total de su pared está constituida por elementos musculares lisos, lo que le asegura una

fuerza tensil similar o superior a la de una arteria de similares dimensiones. Estructuralmente, su túnica media está formada por dos capas, una interna, compuesta fundamentalmente por fibras musculares lisas dispuestas en sentido longitudinal y por fibras elásticas, y otra externa, más gruesa, que contiene fibras musculares lisas dispuestas circularmente.³

La vena safena interna es muy rica en válvulas, aunque su número, situación y desarrollo se encuentran sujetos a una gran variabilidad individual. La válvula venosa consiste en dos pliegues de íntima con un refuerzo central de tejido conjuntivo, aunque pueden incluir elementos constitutivos de la túnica media, implantada sobre un anillo fibroso, por encima del cual la pared venosa es más delgada.³

Usos clínicos de la vena safena

Desde el punto de vista estructural, la vena safena es más fuerte y resistente a la presión arterial que cualquier otra vena. Debido a su localización superficial, es de fácil acceso y disponibilidad, pudiéndose llevar a cabo su extracción sin producir alteraciones importantes sobre el retorno venoso de la extremidad. De gran longitud y calibre y de grosor similar a las arterias de mediano calibre, presenta además, otras dos cualidades que la hacen única como sustituto arterial: la presencia de células endoteliales en su superficie luminal y una complianza similar a la de las arterias.

Debido a todas estas características se convierte en el conducto de elección en procedimientos de reconstrucción vascular de los sectores fémoro-poplíteo y distal⁴ y revascularización coronaria, incluso en algunas ocasiones, se ha utilizado para la reconstrucción de diversas arterias como las carótidas, renales o mesentéricas.

La revascularización coronaria (bypass aorto-coronario) es el tratamiento de elección en muchos enfermos con isquemia coronaria que no responden adecuadamente al tratamiento médico. La primera intervención en la que se practicó un injerto aorto coronario se debe a Sabinston en 1963.⁵ Sin embargo, fue Garret quien en 1964 realizó la primera revascularización coronaria con éxito mediante un pontaje con vena safena interna desde aorta hasta arteria coronaria descendente anterior izquierda, permaneciendo permeable siete años después de la intervención.⁶

Aunque los injertos de vena safena habían sido empleados de forma esporádica para reconstrucción coronaria al principio de la década de los 60, fue a partir de 1968 cuando se popularizó su uso de forma satisfactoria.⁷⁻⁹

Regulación del tono vascular

En general el tono vascular está regulado por la influencia simultánea y coordinada de sustancias vasoactivas intravasculares, productos celulares perivasculares y neurotransmisores.

Durante años el interés se ha centrado en la capa media de la pared vascular, formada principalmente por músculo liso. Esta capa actúa como sistema efector donde se produce la contracción y relajación vascular.

Papel modulador del endotelio

Cuando en 1862 von Recklinghausen¹⁰ describió por primera vez el endotelio vascular, no pudo imaginar, como tampoco muchos después de él, que lo que habían considerado una simple barrera semipermeable que permitía el intercambio de líquido y solutos entre la sangre y los tejidos, iba a convertirse en un órgano con una papel preponderante en la homeostasis vascular.^{11;12} Ahora, cerca de 150 años después, sabemos que el endotelio desempeña un papel esencial en diversas funciones como angiogénesis, fluidez de la sangre, transporte capilar, interacción pared vascular-elementos sanguíneos y estructura vascular.^{11;13-15} El endotelio normal elabora prostanoïdes y otras sustancias paracrinas que mantienen un equilibrio preciso entre vasodilatación y vasoconstricción, coagulación y fluidez sanguínea, estímulo e inhibición del factor de crecimiento vascular, estímulo e

inhibición de la agregación plaquetaria. El endotelio también es capaz de intervenir en el metabolismo de sustancias vasoactivas circulantes tales como adrenalina, serotonina, bradiquinina y angiotensina.^{11;13;14;16;17}

La función más relevante del endotelio con respecto a nuestro trabajo es la regulación del tono vascular. Esta regulación se ejerce mediante la síntesis y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que modulan el grado de contracción del músculo liso y la respuesta vascular a estímulos neurohumorales de diversa índole.

En 1980 Furchgott y Zawadski¹⁸ descubrieron que el endotelio de la aorta torácica de conejo liberaba un factor que producía relajación en respuesta a la acetilcolina. La relajación no se producía cuando se destruía de forma mecánica el endotelio. La conclusión alcanzada fue que la acetilcolina, actuando sobre receptores muscarínicos endoteliales estimulaba la liberación de un factor relajante. Este factor recibió el nombre de EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor). Posteriormente se demostró que otras sustancias vasodilatadoras (bradiquinina, sustancia P, histamina, calcitonina, péptido intestinal vasoactivo, o ionóforo del Ca^{2+} A-23187) ejercían sus efectos a través de la liberación endotelial de sustancias relajantes.^{19;20} Además, el endotelio no sólo interviene en la vasodilatación inducida por diversas sustancias sino que también es capaz de inhibir la vasoconstricción producida por diversos agentes y de modular el efecto de los

neurotransmisores liberados de las terminaciones nerviosas perivasculares en diversas especies animales²¹⁻²³ y en el hombre.²⁴⁻²⁷ Concretamente en la vena safena se ha demostrado que el endotelio es capaz de amortiguar la contracción adrenérgica.²⁸

Entre 1986 y 1988 dos grupos de investigadores^{29;30} propusieron que el EDRF podría ser óxido nítrico. En 1987, Palmer *et al.*²⁹ estudiaron la liberación del EDRF y el óxido nítrico por quimioluminiscencia y midieron la actividad relajante por bioensayo. La relajación producida por el EDRF fue comparable a la producida por el óxido nítrico. Ambas sustancias eran igualmente inestables y la relajación, producida tanto por el óxido nítrico como por el EDRF, fue inhibida por la hemoglobina, que destruye el óxido nítrico, y aumentada por la superóxido dismutasa, que destruye los aniones superóxido. Otro grupo de investigadores^{30;31} demostró por medios farmacológicos y químicos que el EDRF liberado de arterias y venas era óxido nítrico.

El óxido nítrico se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de una familia de enzimas, las sintasas de NO.^{32;33} Se ha demostrado la existencia de dos sintetisas de óxido nítrico.³⁴ La óxido nítrico sintasa constitutiva se localiza en el endotelio vascular, plaquetas, neuronas del sistema nervioso central y en nervios periféricos no adrenérgicos, no colinérgicos. La óxido nítrico sintasa inducible se localiza en macrófagos y en otras células del sistema inmunitario. La liberación de óxido nítrico del endotelio es un proceso

dependiente de Ca^{2+} .³⁵ El óxido nítrico liberado tiene una vida media muy corta en condiciones de bioensayo (3-6 s) y en cultivos de células endoteliales (aproximadamente 30 s),^{36,37} es fácilmente oxidado por el oxígeno del medio o por radicales libres de oxígeno³⁶ para formar NO_2 . La superóxido dismutasa, enzima que metaboliza los aniones superóxido, puede retardar la activación del óxido nítrico.³⁸

El óxido nítrico actúa a través de la guanilato ciclasa en la célula diana. El óxido nítrico es una sustancia lipofílica, lo que le permite difundir fácilmente a través de la zona abluminal del endotelio hacia el músculo liso vascular e interactuar con el grupo hemo de la guanilato ciclasa para producir la activación enzimática.³⁹ La activación de la guanilato ciclasa estimula la conversión de guanosín-5-trifosfato (GTP) a guanosín 3',5'cíclico monofosfato (GMPc) (*Figura 2*). La acumulación de GMPc en la célula conduce a una cascada de acontecimientos cuyo resultado final es la disminución del Ca^{2+} citosólico y la inducción de relajación.⁴⁰ Este mecanismo es el mismo que utilizan compuestos como la nitroglicerina y el nitroprusiato sódico (nitrovasodilatadores).

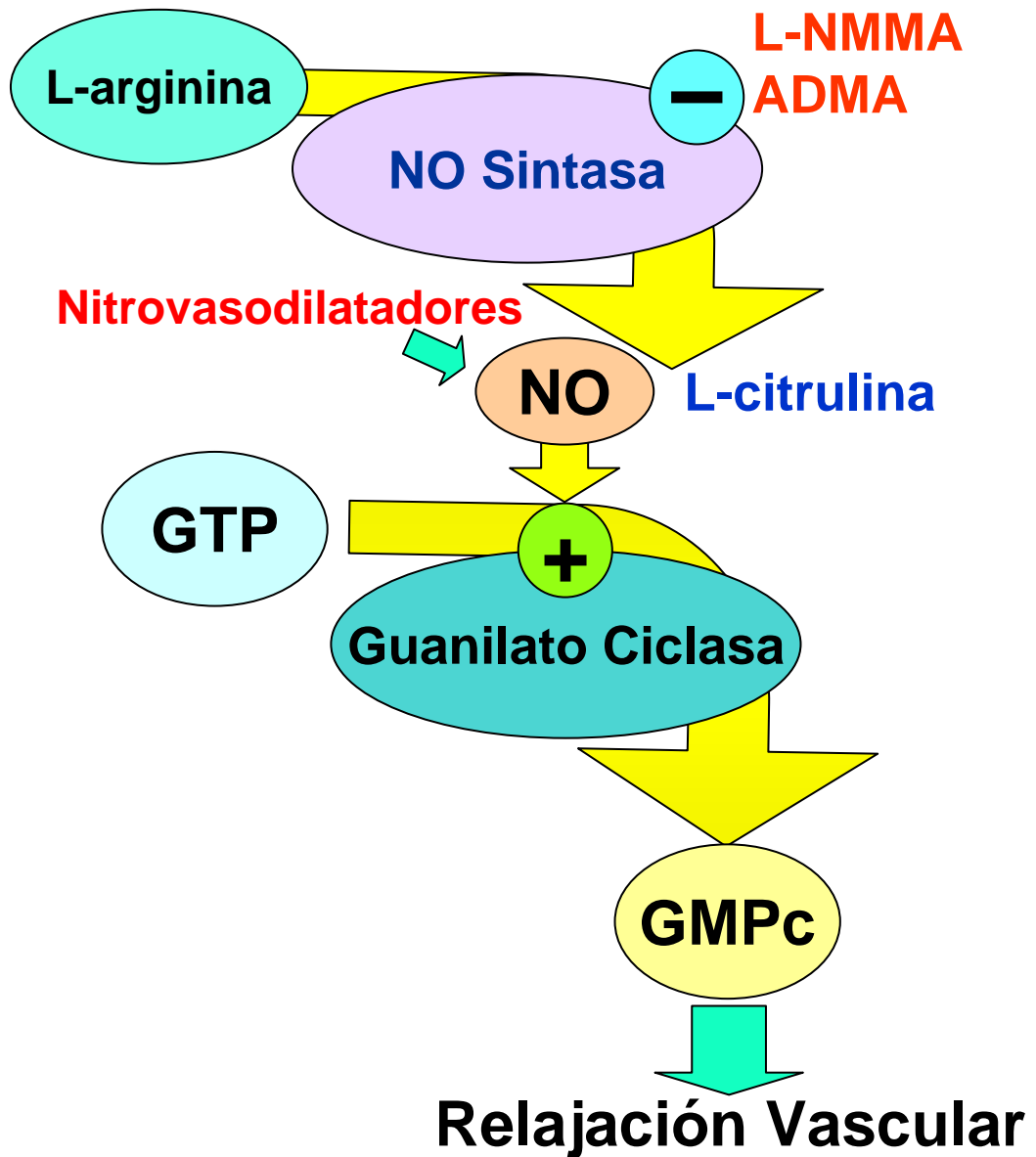


Figura 2. Esquema de la vía de formación de óxido nítrico (NO) y relajación vascular a través del GMPc.

L-NMMA, N^G-monometil-L-arginina; ADMA, N^G,N^G-dimetilarginina asimétrica; GTP, guanosín 3',5' cíclico monofosfato; +, estímulo; -, inhibición.

Estos compuestos, cuya eficacia clínica se conoce desde hace tiempo, liberan óxido nítrico, de forma espontánea a través de una reacción enzimática.⁴⁰

Diversos análogos de la L-arginina como la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) y la N^G-nitro-L-arginina metil éter (L-NAME) son inhibidores competitivos de la síntesis^{41;42} y de la liberación^{32;33;43} de óxido nítrico de las células endoteliales. La relajación inducida por el óxido nítrico se inhibe en presencia de estos inhibidores de la óxido nítrico sintetasa, tanto *in vitro*^{44;45} como *in vivo*.^{11;46;47} El estudio de los efectos del L-NMMA ha sido de gran utilidad para la identificación de las funciones del NO y su papel en algunas situaciones fisiopatológicas.⁴⁸

Anteriormente al descubrimiento del EDRF por Furchgott y Zawadski,¹⁸ en 1976 Moncada *et al.* descubrieron que el endotelio vascular era capaz de sintetizar y liberar una sustancia prostanoide con actividad anticoagulante y que además producía relajación del músculo liso vascular.⁴⁹ Esta prostaglandina de origen endotelial inicialmente recibió el nombre de prostaglandina X y pronto fue identificada como prostaciclina (PGI₂).⁵⁰ La síntesis de la PGI₂ se inicia con la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos unidos a la membrana de las células endoteliales por la acción de las fosfolipasas. El ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa se metaboliza a prostaglandina G₂ y esta a su vez a prostaglandina H₂.⁵¹ El

metabolismo de la prostaglandina H₂ puede seguir distintas rutas, en el caso de que sea transformada por la prostaciclina sintasa, se formará PGI₂.

La PGI₂ es el principal prostanoides sintetizado por las células endoteliales. Al igual que el óxido nítrico, la PGI₂ es liposoluble y muy inestable en condiciones fisiológicas. La PGI₂ no se almacena, de tal manera que una vez sintetizada sale de la célula endotelial. En la sangre va a actuar como anticoagulante y en el músculo liso vascular va a producir relajación (para revisión ver Parkington *et al.*⁵²).

La interacción de la PGI₂ con su receptor situado en la membrana plasmática de la célula de músculo liso vascular produce la activación de la adenilato ciclasa y un incremento en la producción de adenosin 3',5'cíclico monofosfato (AMPC).^{53;54} El AMPC activa a la proteína quinasa A, que fosforila diversas proteínas cuyo resultado final es la eliminación del Ca²⁺ citoplasmático y la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺, lo que induce la relajación del músculo liso. Además la PGI₂ también puede inducir relajación al producir hiperpolarización del músculo liso vascular⁵⁵⁻⁶¹ y puede modular el tono vascular indirectamente al inhibir la liberación de neurotransmisores que producen contracción de los terminales nerviosos perivasculares.⁶¹

Estudios posteriores realizados en diversos lechos vasculares, demostraron que agonistas como la acetilcolina inducían relajación incluso cuando estaba inhibida la síntesis de óxido nítrico y prostaciclina, resultados que confirman la existencia de un tercer factor relajante producido por el endotelio. Este factor producía hiperpolarización de la membrana de las células de músculo liso por lo que se denominó EDHF (Endothelium–Dependent Hiperpolarizing Factor).⁶²⁻⁶⁴

Hasta el momento no hay unanimidad en cuanto a la identidad o mecanismos de acción por el que el EDHF produce relación del músculo liso vascular. En el hombre, la existencia del EDHF ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*.⁶⁵⁻⁶⁸ Diversas sustancias se han propuesto como posibles EDHF, entre las que se encuentran los iones K^+ procedentes del endotelio,⁶⁹ ácido epoxieicosanoico,^{70;71} peróxido de hidrógeno,⁷²⁻⁷⁴ anandamina⁷⁵ y péptido natriurético tipo C.⁷⁶ De hecho, es posible que la naturaleza del EDHF sea distinta entre los diferentes lechos vasculares y diferentes especies.⁷⁷ En la arteria mamaria humana, el EDHF es el ácido 11,12-epoxieicosatrienoico que es producido por una o más isomorfias de la citocromo P450 y es el responsable de aproximadamente el 40% de la relajación dependiente del endotelio.⁷⁸ Por otra parte, estudios realizados en arterias pequeñas sugieren que sustancias vasorrelajantes como la acetilcolina inducen la

liberación de EDHF al abrir canales de K^+ en el endotelio que son inhibidos por la combinación de charibdotoxina y apamina.^{68;69;79;80}

La participación del endotelio en el control del tono muscular no solo se limita a la liberación de factores dilatadores sino que además produce al menos 5 factores que inducen contracción (EDCF, Endothelium Derived Contracting Factors): tromboxano A_2 , radical superóxido, prostaglandina $F_{2\alpha}$, endotelina y angiotensina.⁸¹⁻⁸³

Hormonas tiroideas

Síntesis

La síntesis y secreción de hormonas tiroideas está finamente regulada por un proceso de retroalimentación negativo en el que interviene el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.⁸⁴ La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) se sintetiza en el núcleo paraventricular del hipotálamo y por transporte axonal alcanza la hipófisis anterior donde se une a receptores específicos en las células tirotropas estimulando en ellas la producción de tirotrópina (TSH). La TSH es el regulador primario de la secreción y liberación de hormonas tiroideas así como un factor determinante del desarrollo y crecimiento de la glándula tiroidea (para revisión ver Yen *et al.*⁸⁵).

Alrededor del 93% de la secreción de la glándula tiroidea corresponde a la 3,3',5,5'-tetrayodo-L-tironina (Tiroxina, T_4)⁸⁶ y el resto

a T₃, aunque casi toda esta T₄ se transformará en T₃ en los tejidos periféricos.^{87;88}

Solo un bajo porcentaje de T₄ y de T₃ (0.03% y 0.3% respectivamente) se transporta libre en plasma, el resto se une a globulina fijadora de tiroxina (TBG), prealbúmina y albúmina. La TBG tiene una afinidad para la T₄ 10 veces mayor que para la T₃.⁸⁹

La T₄, la principal secreción de glándula tiroides, necesita ser convertida a T₃ por la yodotironina deydinasa para ejercer su acción biológica. Hay dos isoenzimas que catalizan esta acción, yodotironina deydinasa tipo 1 y tipo 2.^{90;91}

La yodotironina deydinasa tipo 1 se localiza en tejidos periféricos como el hígado y riñón y es responsable de la conversión de la mayor parte de T₄ en T₃ circulante. La yodotironina deydinasa tipo 2 se localiza mayoritariamente en cerebro, hipófisis y tejido adiposo, y convierte la T₄ en T₃ para su utilización intracelular.⁹² Diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de la yodotironina deydinasa tipo 2 en células de músculo liso vascular.^{93;94} La presencia de esta enzima en el músculo liso sugiere que estas células son una diana de la acción de la hormona tiroidea, y que poseen la capacidad de convertir la T₄ a la hormona activa T₃ para producir sus efectos fisiológicos.^{95;96}

Mecanismo de acción

La T_3 libre, o biológicamente activa, atraviesa la membrana celular por difusión facilitada. A pesar que puede ejercer sus efectos en diversos lugares intracelulares, sus efectos primarios se producen a nivel genómico y están mediados por receptores nucleares.^{97;98} Diversos grupos de investigadores han confirmado la existencia de dos receptores isomorfos principales, TR_α y TR_β .⁹⁹ Las isoformas α_1 y β_1 están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, serían los responsables de los efectos genómicos: crecimiento, diferenciación o producción de calor. La isoforma β_2 se localiza en la hipófisis y desempeña un papel fundamental en la regulación por retroalimentación negativa entre hormonas tiroideas y TSH. Por último, la isoforma α_2 puede producir inhibición de las acciones hormonales.^{100;101}

Además de los efectos nucleares o genómicos, las hormonas tiroideas producen ciertos efectos que son resultado de acciones no-genómicas que implican lugares de acción extranucleares.¹⁰² Entre ellos se pueden citar el estímulo de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa,¹⁰³ la actividad de la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos de la adenilato ciclasa^{104;105} y aumento de la conductancia al Na^+ .^{106;107} Estos efectos no-genómicos se han caracterizado de manera más precisa durante la exposición aguda de hormonas tiroideas en células

desprovistas de núcleo o en condiciones experimentales donde los procesos de transcripción y traducción celular han sido inhibidos.¹⁰⁸

Papel de las hormonas tiroideas en la función cardiovascular

La hormona tiroidea ejerce diversos efectos sobre el corazón y el sistema vascular.¹⁰⁹ Muchas de las manifestaciones clínicas del hipertiroidismo son debidas a la capacidad de la hormona tiroidea de modificar la hemodinámica cardiovascular.¹¹⁰ Los efectos hemodinámicos del hipotiroidismo son opuestos a los del hipertiroidismo, aunque las manifestaciones clínicas son menos obvias. La frecuencia, el gasto cardiaco y la resistencia vascular sistémica están estrechamente relacionados con la función tiroidea. El incremento de la frecuencia cardiaca, amplitud de la presión de pulso y aumento del gasto cardiaco de pacientes con hipertiroidismo se asemeja a un estado de aumento de la actividad adrenérgica,¹¹¹ a pesar de la normal o baja concentración sérica de catecolaminas.¹¹² El estudio de la interacción de la adrenalina con su receptor en la membrana plasmática ha demostrado que los receptores β -adrenérgicos, proteínas reguladoras y adenilato ciclasa tipo V y VI están alteradas por cambios en el estado tiroideo. Diversos transportadores iónicos de la membrana plasmática, tales como la Na^+ - K^+ -ATPasa, canales intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y canales de K^+ sensibles a voltaje están regulados tanto a nivel transcripcional como

post-transcripcional por la hormona tiroidea.^{113;114} De esta forma la hormona tiroidea coordina las respuestas electroquímicas y mecánicas del miocardio.

Aunque hay unanimidad en cuanto a los efectos relajantes de la T₃ sobre el músculo liso vascular,¹¹⁵⁻¹¹⁷ existen discrepancias en cuanto al mecanismo responsable implicado en dicha relajación. Por una parte la relajación es dependiente de la presencia de endotelio,^{117;118} y estaría mediada por la liberación de óxido nítrico¹¹⁸ o por la participación conjunta de óxido nítrico, PGI₂ y EDHF.¹¹⁷ Por otra parte, diversos estudios demuestran que la eliminación de la capa endotelial no modifica la relajación inducida por T₃.^{115;116}

Estudios realizados en anillos de aorta de ratas hipertiroideas demuestran una disminución de la respuesta a diversas sustancias vasoconstrictoras¹¹⁹⁻¹²¹ y un incremento de la relajación dependiente del endotelio a la acetilcolina¹²¹ cuando se comparan con segmentos de aorta de ratas eutiroideas. Resultados similares se han observado en la arteria tiroidea humana procedente de pacientes hipertiroideos tratados con metimazol,¹²² donde se observa un incremento de la respuesta relajante a la acetilcolina y una disminución de la respuesta contráctil a la noradrenalina. Estos efectos del hipertiroidismo se han atribuido a un incremento de la síntesis y liberación de óxido nítrico.^{122;123} En ratas hipertiroideas hay un incremento de la actividad

de la óxido nítrico sintasa^{124;125} así como de la expresión de la enzima.¹²⁵

Existen diferencias en la respuesta relajante vascular dependiente del endotelio entre animales a los que se les induce hipertiroidismo de forma aguda o crónica.¹²⁶ En ratas a las que se les induce hipertiroidismo agudo, la respuesta relajante dependiente del endotelio en anillos de arteria renal estaba incrementada comparada con ratas eutiroideas. Esta respuesta relajante incrementada estaba mediada por la participación conjunta de óxido nítrico y EDHF. Sin embargo, en ratas a las que se les induce hipertiroidismo crónico la respuesta relajante dependiente del EDHF disminuyó, mientras que la mediada por óxido nítrico permaneció incrementada.¹²⁷

Por otra parte, se ha demostrado que el hipertiroidismo puede producir efectos contrarios a los anteriormente citados y disminuir la relajación dependiente del endotelio mediada por óxido nítrico en el cuerpo cavernoso de conejos hipertiroideos y la relajación neurógena no-adrenérgica no colinérgica.¹²⁸

La T₃ puede producir algunos de sus efectos vasculares de forma indirecta. En pacientes hipertiroideos existe un incremento de los niveles plasmáticos de N^G, N^G-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA).¹²⁹ El ADMA es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa¹³⁰ que produce contracción (dependiente de la presencia de endotelio) en diversos lechos vasculares humanos.¹³¹⁻¹³³ Este incremento de los niveles de

ADMA observado en pacientes hipertiroideos podría ser un mecanismo compensador para disminuir la excesiva producción de óxido nítrico y compensar la excesiva vasodilatación periférica.¹²⁹

* * *

Paralelamente al desarrollo de la técnica de bypass coronario con injertos vasculares se han realizado estudios farmacológicos. Los injertos vasculares tienen tendencia a presentar vasoespasmos durante la intervención. Por tanto, es importante conocer los mecanismos que regulan la respuesta a diversas sustancias en la vena safena humana. En la mayoría de ellos se emplean métodos *in vitro*, en segmentos de injertos procedentes de intervenciones quirúrgicas de revascularización coronaria. La ventaja de estos métodos es que el vaso se estudia en un baño de órganos bajo condiciones controladas y por lo tanto la dosis y la respuesta a los agentes farmacológicos (vasoconstrictores y vasodilatadores) pueden ser calculadas con exactitud con una técnica relativamente sencilla.^{134;135} Sin embargo, los resultados de estos estudios *in vitro* deben ser trasladados cuidadosamente al marco clínico donde las condiciones de los injertos vasculares son más complicadas.

Hipótesis

A pesar de que desde hace tiempo se sabe que la hormona tiroidea ejerce efectos sobre el sistema vascular¹⁰⁹ estudios recientes demuestran que la T₃ tiene efectos directos sobre el músculo liso vascular.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Sin embargo no se conocen los efectos directos de la hormona sobre vasos humanos ni los mecanismos que pueden mediar dicha respuesta.

Nuestro trabajo se ha dirigido hacia la comprobación y desarrollo de las siguientes hipótesis específicas:

- Los experimentos en segmentos aislados de vena safena humana pueden revelar los efectos directos y agudos de la hormona tiroidea sobre la función motora de la pared vascular.
- Los efectos de la hormona tiroidea pueden estar mediados o regulados por sustancias de origen endotelial o bien pueden producirse directamente sobre el músculo liso.
- Los efectos agudos de la T₃ pueden estar mediados por segundos mensajeros como el AMPc o GMPc.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar la respuesta de la vena safena, vaso utilizado en el bypass coronario, a la T₄ y a la T₃ y desvelar un posible papel del endotelio.

Objetivos específicos.

1. Determinar la respuesta a la T₃ y a la T₄ en anillos de vena safena humana.
2. Valorar la participación del endotelio mediante la síntesis y liberación de óxido nítrico, prostaciclina o EDHF en la respuesta a la T₃.
3. Determinar la participación de los canales de K⁺ y la Na⁺,K⁺-ATPasa en la respuesta vascular a la T₃ y determinar el papel de los segundos mensajeros AMPc y GMPc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

En este trabajo se ha utilizado, como material biológico, muestras de vena safena humana procedentes de pacientes sometidos a bypass coronario por arteriopatía coronaria. La vena safena utilizada se obtuvo de la parte interna de la pierna y se utilizaron 4 ó 5 cm de cada paciente. Las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia. De los pacientes intervenidos, 29 fueron varones y 11 mujeres (edad 64 ± 5 años).

La realización de este trabajo cuenta con la aprobación de la Comisión Ética de la Facultad de Medicina-Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La conservación y traslado de las muestras hasta el laboratorio se realizó en solución salina fisiológica en frío, transcurriendo entre 30 y 60 minutos desde la obtención de la muestra hasta el inicio del experimento.

Procedimiento experimental

Preparación de los segmentos venosos

La disección y limpieza de las venas se realizó en una placa Petri con solución fisiológica (NaCl 0.9%) fría, bajo una lupa de

disección (Wild M3C) iluminada con luz fría (Euromex EK-1). Las muestras se cortaron en segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud, con un diámetro externo medido en fresco de 3-5 mm.

Tensión isométrica

El procedimiento de montaje consistió en introducir dos alambres finos (120 micras de diámetro) y rígidos de acero inoxidable, a través de la luz del segmento venoso. Uno de los alambres queda fijo a un soporte y el otro se sujeta a un transductor de tensión isométrica (FT 03 Grass Instruments). Cada segmento vascular, con los alambres introducidos en su luz, se introdujo en un baño de órganos que contenía 4 ml de una solución Krebs-Henseleit modificada, con la siguiente composición en mM: NaCl 115, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, MgCl₂·6, H₂O 1.2, glucosa 5.5, ácido ascórbico 0.014, EDTA disódico 0.01 y un tampón orgánico MOPS, 6.5. La solución se burbujeó continuamente con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), manteniéndose el pH entre 7.3-7.4. La temperatura de la solución se mantuvo constante a 37°C durante todo el experimento mediante un circuito de agua caliente que rodea los baños de órganos. Un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permite aplicar al anillo vascular la fuerza de distensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un

ordenador Macintosh, mediante el software Chart v 3.4/s y un sistema de adquisición de datos MacLab 8/e (AD Instruments) (*Figura 3*).

En el presente estudio se pretende valorar la posible participación del endotelio vascular en la respuesta vascular a la hormona tiroidea por lo que en algunos segmentos se eliminó el endotelio mediante la introducción de un fiador metálico rugoso a través de la luz vascular y con la ayuda de un pincel se desplazó el segmento venoso en sentido longitudinal y transversal. La integridad funcional del endotelio se comprobó observando la presencia de relajación provocada por la acetilcolina (10^{-7} - 3×10^{-7} M) (*Figura 4*).¹⁸ En algunas ocasiones al finalizar el experimento se comprobó la presencia o ausencia de endotelio mediante microscopía óptica utilizando una tinción de plata.¹³⁶

Determinación de la tensión pasiva óptima

Antes de analizar la respuesta de los anillos venosos a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares en anillos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello se registró la contracción producida por el KCl (100 Mm) después de exponer los anillos venosos a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión

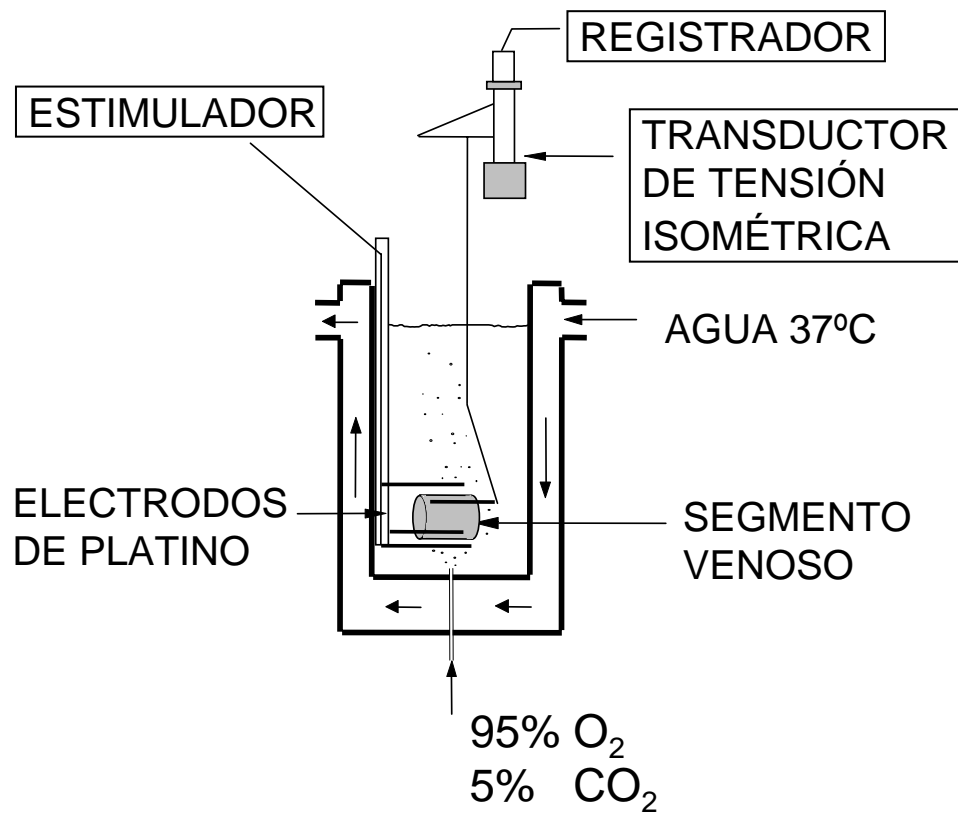


FIGURA 3.- Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para registrar la contracción isométrica de los segmentos venosos.

VENA SAFENA HUMANA

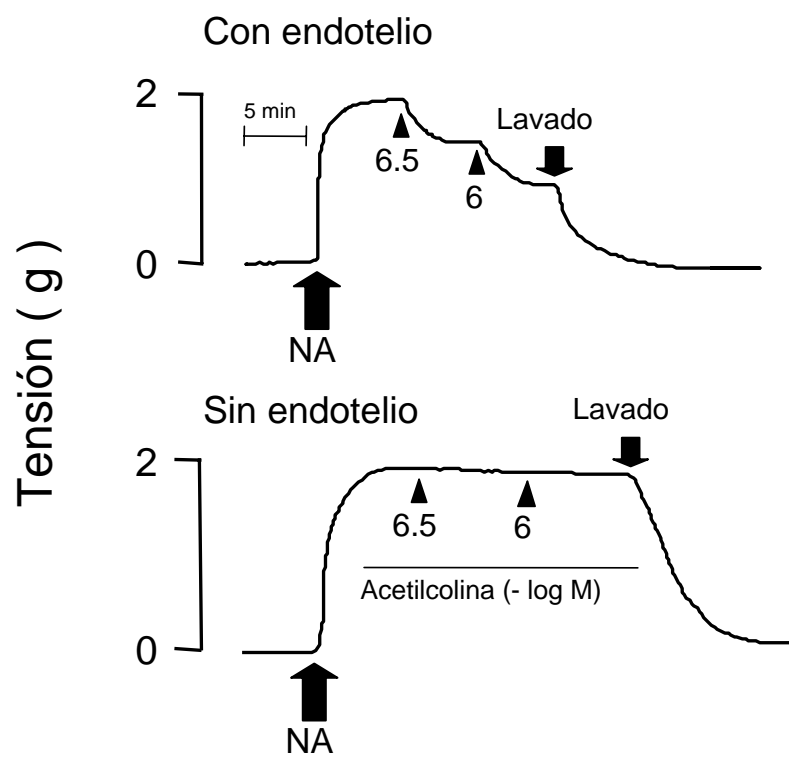


FIGURA 4. Registro de los efectos producidos por la acetilcolina en segmentos venosos con y sin endotelio, previamente contraídos con noradrenalina (NA, 10^{-7} M).

pasiva a la que se obtuvo la máxima respuesta fue considerada como la tensión basal óptima. La tensión óptima de reposo fue de 3 g (*Figura 5*).

Una vez montados los segmentos venosos se les aplicó mediante el tornillo micrométrico la tensión óptima y dado que la respuesta inmediata de los segmentos venosos es la relajación, la tensión se reajusta periódicamente, cada 10-15 minutos, hasta alcanzar el equilibrio en un periodo de 1 a 2 horas. Durante este tiempo, el líquido nutritivo se renueva cada 10 minutos.

Determinación de la capacidad contráctil

Para determinar la viabilidad de la capa muscular se procedió a valorar la capacidad contráctil de los segmentos venosos al KCl (100 mM). La adición de KCl (100 mM) produjo una contracción que rápidamente alcanzó el efecto máximo. Tras el lavado los segmentos recuperaron la tensión basal. La adición de KCl 100 mM se repite hasta que dos respuestas consecutivas sean la misma ($P > 0.05$). La contracción media de los segmento de vena safena al KCl 100 mM fue de 7.6 ± 0.6 g. La respuesta al KCl fue similar en anillos con y sin endotelio, indicando que el proceso de eliminación del endotelio no daña la capa muscular subyacente. Se consideraron válidos todos

VENA SAFENA HUMANA

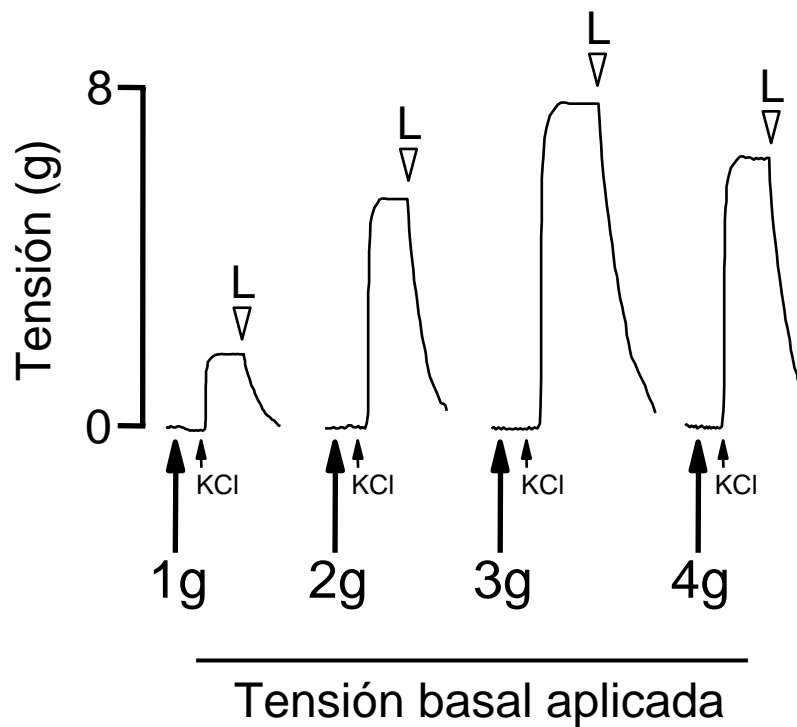


Figura 5. Determinación de la tensión pasiva óptima. Respuesta al cloruro potásico (KCl, 100 mM) de los segmentos arteriales a tensiones basales crecientes. (L) Lavado.

aquellos segmentos que alcanzaron una contracción superior a 3.8 g (50% de la respuesta media al KCl 100 mM).

Curvas concentración- respuesta

Una vez que el segmento venoso mantiene constante la tensión basal óptima, se obtuvieron las curvas concentración-respuesta acumulativamente, de forma que la concentración de agonista en el baño cuando se aplica una concentración es la resultante de la suma de ésta última con las administradas anteriormente. El cambio de concentración se llevó a cabo cuando la anterior desarrolló su efecto máximo.

Participación del endotelio en la respuesta relajante a la T₃ y T₄

La participación del endotelio en la respuesta relajante a la T₃ y T₄ se analizó en anillos venosos, con y sin endotelio procedentes del mismo paciente. La confirmación de la presencia o ausencia de endotelio se confirmó mediante la administración de acetilcolina en anillos previamente contraídos. La adición de concentraciones submáximas de noradrenalina (3×10^{-7} - 10^{-6} M) produce contracción que rápidamente alcanza una contracción estable, en estas condiciones se obtuvieron las curvas concentración respuesta a la T₄ (10^{-9} - 10^{-6} M) y T₃ (10^{-9} - 10^{-6} M).

Para comprobar la participación del óxido nítrico endotelial en la respuesta relajante, se realizaron curvas concentración respuesta a la T_3 en presencia de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) (3×10^{-4} M), un inhibidor de la sintetasa del NO.⁴³ Para analizar la participación de la guanilato ciclasa en la respuesta a la T_3 , se realizaron curvas concentración respuesta a la T_3 en presencia de ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one) (10^{-5} - 3×10^{-5} M), un inhibidor de la guanilato ciclasa.¹³⁷

La participación de sustancias prostanoides en la respuesta a la T_3 , se valoró al realizar curvas concentración respuesta a la T_3 en ausencia y en presencia de indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la ciclooxigenasa.^{138;139}

En otra serie de experimentos se estudió la participación del EDHF en la relajación inducida por la T_3 , para lo cual se realizaron curvas concentración respuesta a la T_3 en presencia y en ausencia de inhibidores selectivos de los canales de K^+ . En segmentos venosos previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (3×10^{-4} M) para inhibir la síntesis y liberación de PGI_2 y de NO, se añadió, charibdotoxina (10^{-7} M), inhibidor de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta e intermedia conductancia¹⁴⁰ y apamina (10^{-6} M), inhibidor de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia.¹⁴¹

Efecto de la inhibición de la Na⁺,K⁺-ATPasa y de los canales de K⁺ rectificadores de entrada en la respuesta a la T₃

Para valorar la participación de la Na⁺,K⁺-ATPasa se incubaron los segmentos en presencia de ouabaina (10⁻³ M), un inhibidor selectivo de la Na⁺,K⁺-ATPasa,¹⁴² y se realizaron curvas concentración respuesta a la T₃.

La intervención de los canales de entrada de K⁺ en la respuesta de la vena safena a la T₃ se estudió en segmentos previamente incubados con ouabaína (10⁻³ M), para descartar la participación de la Na⁺,K⁺-ATPasa y de BaCl₂ (10⁻⁶ M) para bloquear los canales de K⁺ rectificadores de entrada.¹⁴³

Efecto de la T₃ sobre la relajación inducida por el nitroprusiato sódico

Para estudiar los efectos de la T₃ en la relajación independiente del endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico (10⁻⁹-3x10⁻⁷M) en ausencia y en presencia de T₃ (10⁻⁷ M).

Los inhibidores se añadieron al baño de órganos 20-30 minutos antes de realizar las curvas concentración-respuesta.

Efecto de la T₃ sobre los niveles de AMPc y GMPc

Los segmentos venosos se cortaron en anillos de 4 mm de longitud y se introdujeron en baños de órganos que contenían 4 ml de una solución de Krebs-Henseleit modificada en las mismas condiciones que las expuestas en los experimentos de tensión isométrica.

Tras un periodo de equilibrio de 20 minutos en el baño de órganos todos los segmentos venosos se incubaron con noradrenalina (10^{-7} M) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 10^{-5} M), un inhibidor inespecífico de las fosfodiesterasas¹⁴⁴ y para impedir la degradación de GMPc y de AMPc. Las muestras utilizadas como control permanecen durante 25 minutos en estas condiciones en el baño de órganos y posteriormente se sacaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido.

En otro grupo de segmentos para estudiar los efectos de la T₃ sobre los niveles de GMPc y AMPc, transcurridos 5 minutos desde la adición de IBMX y noradrenalina, se les añadió T₃ (10^{-8} - 10^{-7} M) y tras 20 minutos de incubación los segmentos se congelaron rápidamente.

Para estudiar la posible participación de la guanilato ciclasa en los efectos de la T₃, los segmentos vasculares se incubaron con ODQ (3×10^{-5} M). El ODQ se añadió al baño de órganos 10 minutos antes de la adición de IBMX (10^{-5} M) y noradrenalina (10^{-7} M). Un grupo de

segmentos se incubó en presencia de ODQ y en ausencia de T_3 para ver como afecta este a los niveles basales de GMPc.

La T_3 podría interaccionar con la guanilato ciclasa e incrementar o inhibir la producción de GMPc por los estímulos que la activan. Para comprobar esta posibilidad se utilizó el nitroprusiato sódico, una sustancia que libera óxido nítrico en el músculo liso vascular activando la guanilato ciclasa e incrementando los niveles de GMPc.¹⁴⁵

Segmentos de vena safena se incubaron con IBMX y noradrenalina, transcurridos 5 min a un grupo de segmentos se les añadió T_3 (10^{-7} M) mientras que otro grupo de segmentos se incubaron en ausencia de T_3 , grupo control. Transcurridos 20 min se les añade nitroprusiato sódico (10^{-7} M) tanto al grupo control como al tratado con T_3 y después de 5 min los segmentos se sacaron rápidamente del baño de órganos y se congelaron.

La actividad de la guanilato ciclasa puede estar regulada por el AMPc.^{146;147} Para comprobar esta posibilidad, segmentos de vena safena se incubaron con forskolina, un activador de la adenilato ciclasa.^{148;149} Los segmentos de vena safena se incubaron con IBMX y noradrenalina, después de 5 min se incubaron en ausencia (control) y en presencia de T_3 y tras 20 min se les añadió forskolina (10^{-8} M) y después de 5 min se sacaron los segmentos rápidamente del baño de órganos y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido.

Determinación de los niveles de AMPc y GMPc

Los segmentos de vena safena congelados previamente en nitrógeno líquido se guardaron a -20 °C para la posterior determinación de GMPc y AMPc. A los segmentos congelados se les añadió 1 ml de una solución fría de ácido tricloroacético (6%) y se homogenizaron con un ultra-turrax T8 (IKA-Werke). Los homogenizados se centrifugaron a 2000 xg durante 15 min a 4 °C. De los centrifugados se recogieron los sobrenadantes de los que se extrajo el ácido tricloroacético añadiendo 5 ml de dietileter saturado de agua. Se mezcló vigorosamente y se dejó en reposo hasta que se separaron las dos fases de las que se eliminó la fase orgánica. Esta operación se repite 4 veces. Una vez eliminado el ácido tricloroacético, las muestras se desecaron con la ayuda de un SC110A SpeedVac concentrador (Thermo Electron Corporation). Posteriormente se determinaron los niveles de AMPc (RPN 225 Biotrak; Amershan Pharmacia Biotech) y GMPc (RPN 226 Biotrak; Amershan Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para determinar la concentración de proteínas, el precipitado obtenido después de la centrifugación del tejido homogenizado se incubó con 1ml de NaOH (0.5 M) hasta que se resuspendió completamente. El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Lowry.¹⁵⁰

Fármacos

Los fármacos utilizados en este trabajo han sido:

- 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma Chemical Co).
- Forskolina (Sigma Chemical Co).
- 3,3',5-triyodo-L-tironina (T₃, Sigma Chemical Co).
- 3,3',5,5'-tetrayodo-L-tironina (Tiroxina, T₄; Sigma Chemical Co).
- Cloruro de acetilcolina (Sigma Chemical Co).
- Noradrenalina clorhidrato (Sigma Chemical Co).
- Acetato de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA, Sigma Chemical Co).
- Nitroprusiato sódico (Sigma Chemical Co).
- 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ, Tocris).
- Indometacina (Sigma Chemical Co)
- Apamina (Sigma Chemical Co)
- Charibdotoxina (Sigma Chemical Co)
- Ouabaina (Sigma Chemical Co)
- Cloruro de Bario (BaCl₂, Sigma Chemical Co).

Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron con agua bidestilada excepto la T₃, T₄, forskolina, indometacina y ODQ que se disolvieron en etanol absoluto (la concentración final de etanol en el baño fue inferior al 0.01%). Las diluciones de los fármacos se realizaron con suero fisiológico.

Cálculos y análisis estadísticos

A partir de los datos experimentales, se calcularon los valores de la media, de la desviación y del error estándar de la media. Con estos resultados se construyeron las curvas concentración-respuesta y los gráficos de barras. La respuesta relajante se expresa como porcentaje de relajación con respecto a la contracción alcanzada con el fármaco constrictor. En cada experimento, n indica el número de pacientes. Al menos 8 segmentos se obtuvieron de cada paciente.

La concentración eficaz 50 (CE_{50}), concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima, se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de regresión no lineal. A partir de estos valores, se calculó para cada grupo de experimentos la media geométrica de la CE_{50} y su intervalo de confianza del 95 %.¹⁵¹ La comparación de las respuestas entre grupos con distintas condiciones experimentales se llevó a cabo mediante un análisis de varianza. Diferencias entre grupos se determinaron por el test de la t de Student. En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Efectos relajantes de la T₃ y la T₄

En segmentos de vena safena humana previamente contraídos con noradrenalina (10^{-6} - 3×10^{-6} M) la administración de T₃ (10^{-9} - 10^{-6} M) o T₄ (10^{-9} - 10^{-6} M) produjo relajación dependiente de la concentración e independiente de la presencia o ausencia de endotelio (*Figura 6 y 7*). La *Tabla 1* presenta los valores de concentración eficaz 50 (CE₅₀) y efecto máximo. No hubo diferencias significativas en los valores de CE₅₀ ni en los de efecto máximo entre los segmentos con y sin endotelio. Estos resultados excluirían un papel modulador del endotelio de la vena safena humana en la respuesta relajante producida por la T₃ o por la T₄.

La respuesta relajante máxima a la T₄ fue aproximadamente un 20% menor que la respuesta relajante a la T₃ (*Figura 8*). Sin embargo no hubo diferencias significativas en los valores de CE₅₀ de las curvas concentración-respuesta inducidas por la T₃ y T₄ (6.5×10^{-9} M *versus* 4.1×10^{-9} M, respectivamente).

Participación de la guanilato ciclasa y de la adenilato ciclasa en la respuesta a la T₃

En segmentos de vena safena humana, la presencia de T₃ (10^{-8} M) produjo un incremento significativo de los niveles basales de GMPc (*Figura 9, Tabla 2*). El incremento de la concentración de T₃ (10^{-7} M)

VENA SAFENA HUMANA

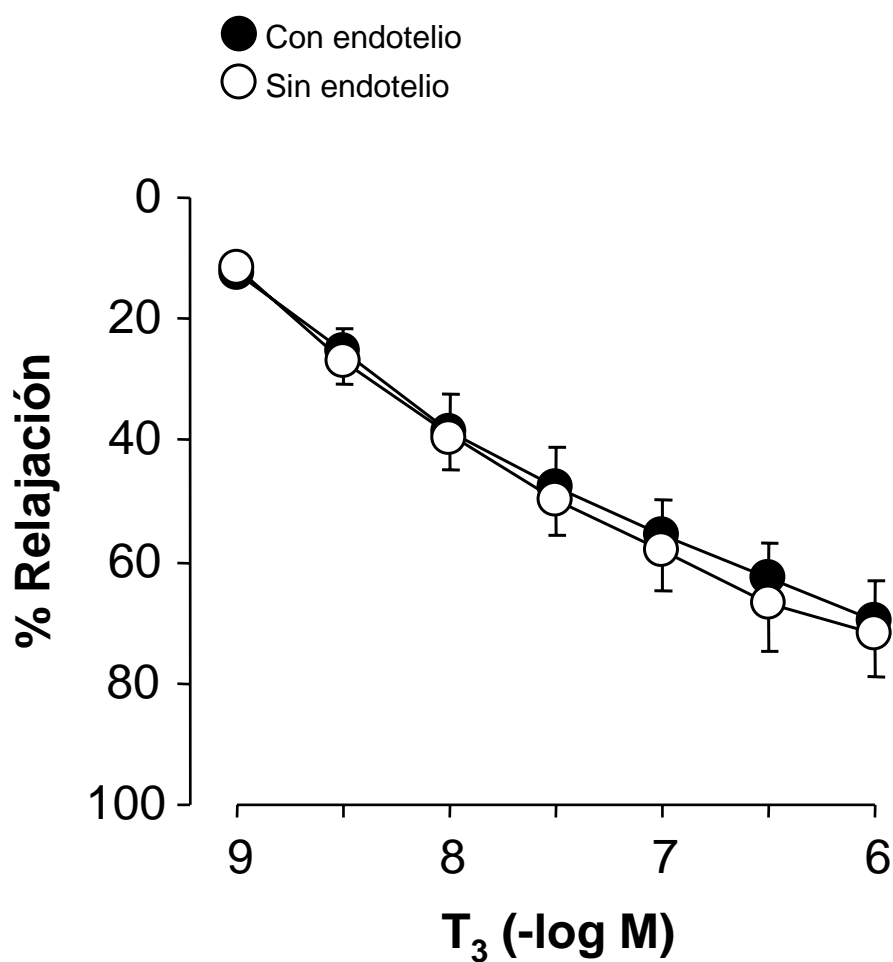


FIGURA 6. Respuesta a la T_3 en segmentos con y sin endotelio. Venas previamente contraídas con noradrenalina.

VENA SAFENA HUMANA

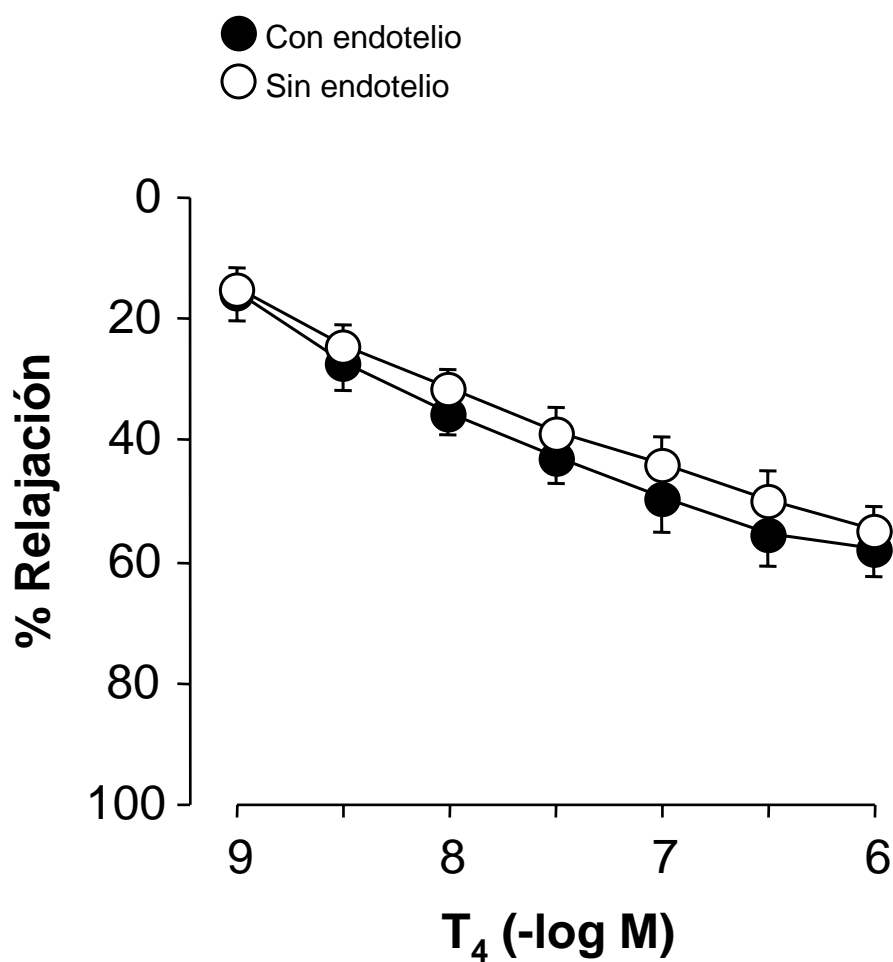


FIGURA 7. Respuesta a la T_4 en segmentos con y sin endotelio. Venas previamente contraídas con noradrenalina.

TABLA 1. Valores de concentración eficaz 50 (EC₅₀, M), su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y del efecto máximo (Emax, relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) ± error estándar (e.e.) de las curvas concentración respuesta a la T₃ y T₄.

	<i>n</i>	EC ₅₀ (IC 95%)	Emax ± e.e. (% Relajación)
T ₃ con endotelio	10	7.7 x 10 ⁻⁹ (4.4 x 10 ⁻⁹ – 1.4 x 10 ⁻⁸)	67 ± 6
T ₃ sin endotelio	8	7.4 x 10 ⁻⁹ (5.1 x 10 ⁻⁹ – 1.1 x 10 ⁻⁸)	72 ± 7
T ₄ con endotelio	5	3.7 x 10 ⁻⁹ (1.9 x 10 ⁻⁹ – 7.3 x 10 ⁻⁹)	58 ± 5*
T ₄ sin endotelio	5	5.3 x 10 ⁻⁹ (2.9 x 10 ⁻⁹ – 9.9 x 10 ⁻⁹)	55 ± 4*

n, número de pacientes. **P*<0.05, comparados con segmentos venosos con endotelio.

VENA SAFENA HUMANA

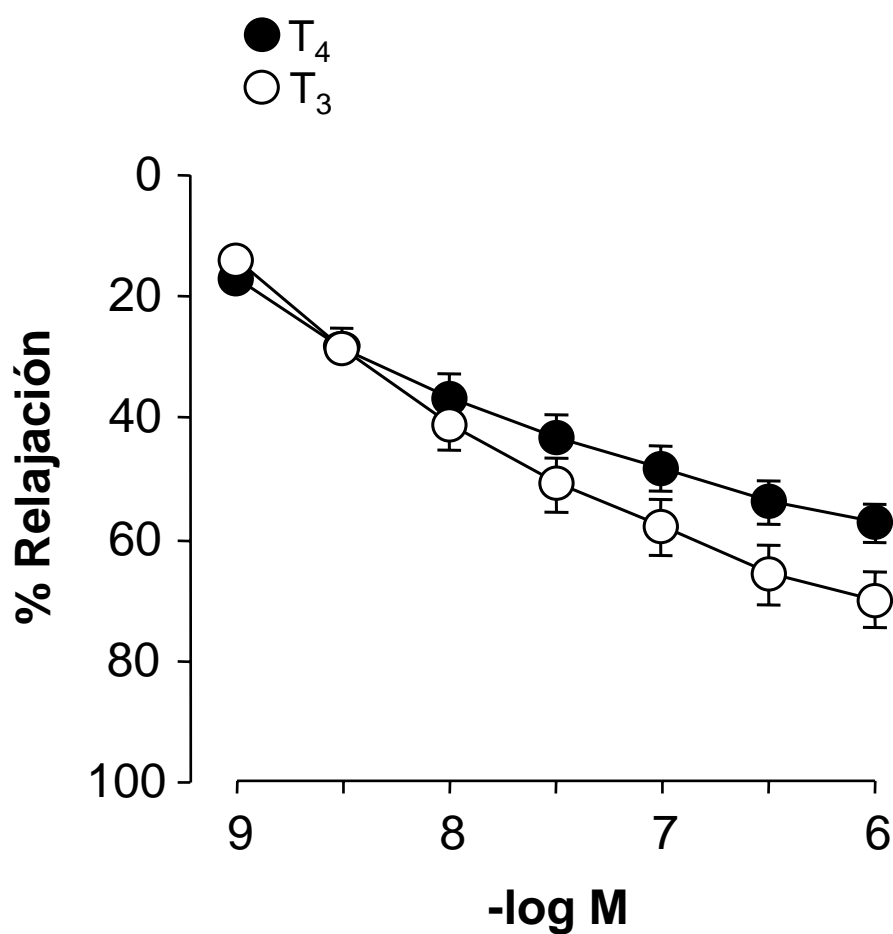


FIGURA 8. Curvas concentración respuesta a la T₄ y a la T₃ en segmentos de vena safena humana previamente contraídos con noradrenalina.

VENA SAFENA HUMANA

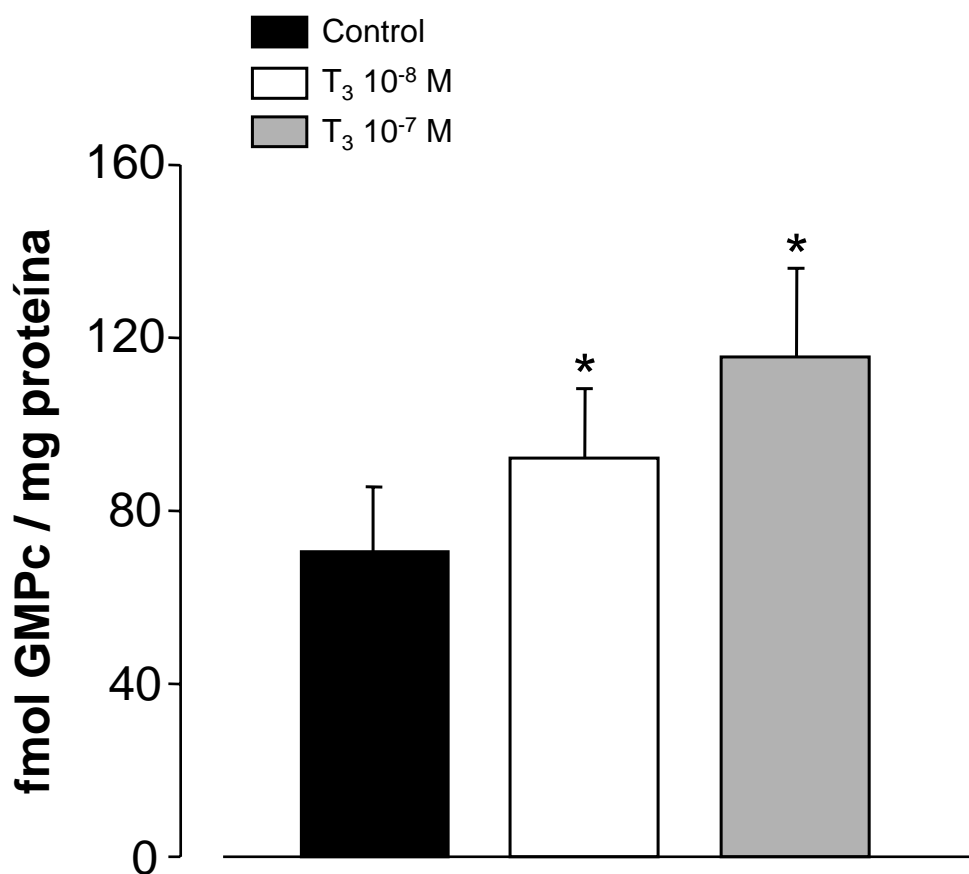


FIGURA 9. Valores medios de los niveles de GMPc expresados en fmol GMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control y tras la incubación con T₃ 10⁻⁸ M y 10⁻⁷ M. **P*<0.05 comparados con el control.

TABLA 2. Valores medios de los niveles de GMPc expresados en fmol GMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃, T₃ más ODQ, forskolina o T₃ más forskolina.

	<i>n</i>	fmol GMPc mg ⁻¹ proteína
Control	9	70 ± 10
T ₃ (10 ⁻⁸ M)	8	92 ± 16*
T ₃ (10 ⁻⁷ M)	8	115 ± 17*
T ₃ (10 ⁻⁷ M) + ODQ (3x10 ⁻⁵ M)	8	75 ± 16
Forskolina (10 ⁻⁸ M)	7	89 ± 4
T ₃ (10 ⁻⁷ M) + forskolina (10 ⁻⁸ M)	7	121 ± 13*

n, número de pacientes. **P*<0.05, comparados con segmentos venosos control.

indujo un aumento mayor de la producción de GMPc. Estos resultados sugieren que la relajación del músculo liso de la vena safena inducida por la T₃, sería debida, al menos en parte, al incremento de los niveles de GMPc.

La adición al baño de órganos de ODQ (10⁻⁵ M), un inhibidor selectivo de la guanilato ciclasa, no modificó ($P>0.05$) la respuesta relajante a la T₃ de la vena safena humana. Sin embargo el incremento de la concentración de ODQ a 3x10⁻⁵ M produjo una inhibición significativa de la respuesta relajante a la T₃ (*Figura 10, Tabla 3*). El ODQ (3x10⁻⁵ M) no modificó ($P>0.05$) los niveles basales de GMPc, pero revirtió el incremento de los niveles de GMPc producidos por la T₃ (*Figura 11, Tabla 2*).

La presencia de forskolina (10⁻⁸ M), un activador de la adenilato ciclasa, no modificó ($P>0.05$) los niveles basales de GMPc en anillos de vena safena humana (*Figura 12, Tabla 2*). El tratamiento con T₃ y forskolina tampoco modificó el incremento de GMPc producido por la T₃. Estos resultados sugieren que la activación de la adenilato ciclasa en la vena safena no produce ningún efecto sobre los niveles basales de GMPc ni sobre el incremento inducido por la T₃ en la vena safena.

En otro grupo de segmentos de vena safena la T₃ (10⁻⁷ M) no modificó los valores de AMPc mientras que la forskolina (10⁻⁸ M)

VENA SAFENA HUMANA

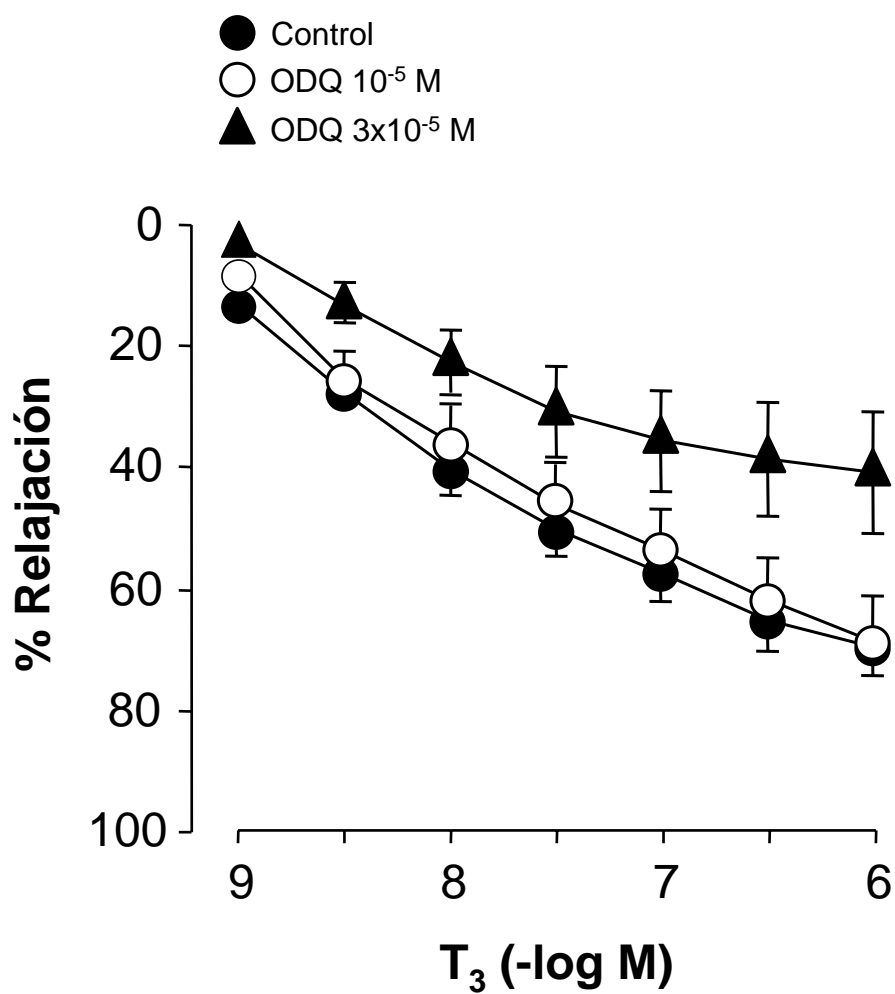


FIGURA 10. Respuesta a la T_3 en ausencia (control) y en presencia de ODQ. Venas previamente contraídas con noradrenalina.

TABLA 3. Valores de concentración eficaz 50 (EC_{50} , M), su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y del efecto máximo (E_{max}), (relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) \pm error estándar (e.e.) de las curvas concentración respuesta a la T_3 en ausencia (control) y en presencia de ODQ.

T_3	n	EC_{50} (IC 95%)	$E_{max} \pm e.e$ (% Relajación)
Control	10	6.5×10^{-9} ($4.6 \times 10^{-9} - 9.2 \times 10^{-9}$)	70 ± 5
ODQ (10^{-5} M)	8	8.6×10^{-9} ($4.4 \times 10^{-9} - 1.7 \times 10^{-8}$)	69 ± 7
ODQ (3×10^{-5} M)	5	7.4×10^{-9} ($4.8 \times 10^{-9} - 1.1 \times 10^{-8}$)	$41 \pm 10^*$

n, número de pacientes. * $P < 0.05$, comparados con segmentos venosos con endotelio.

VENA SAFENA HUMANA

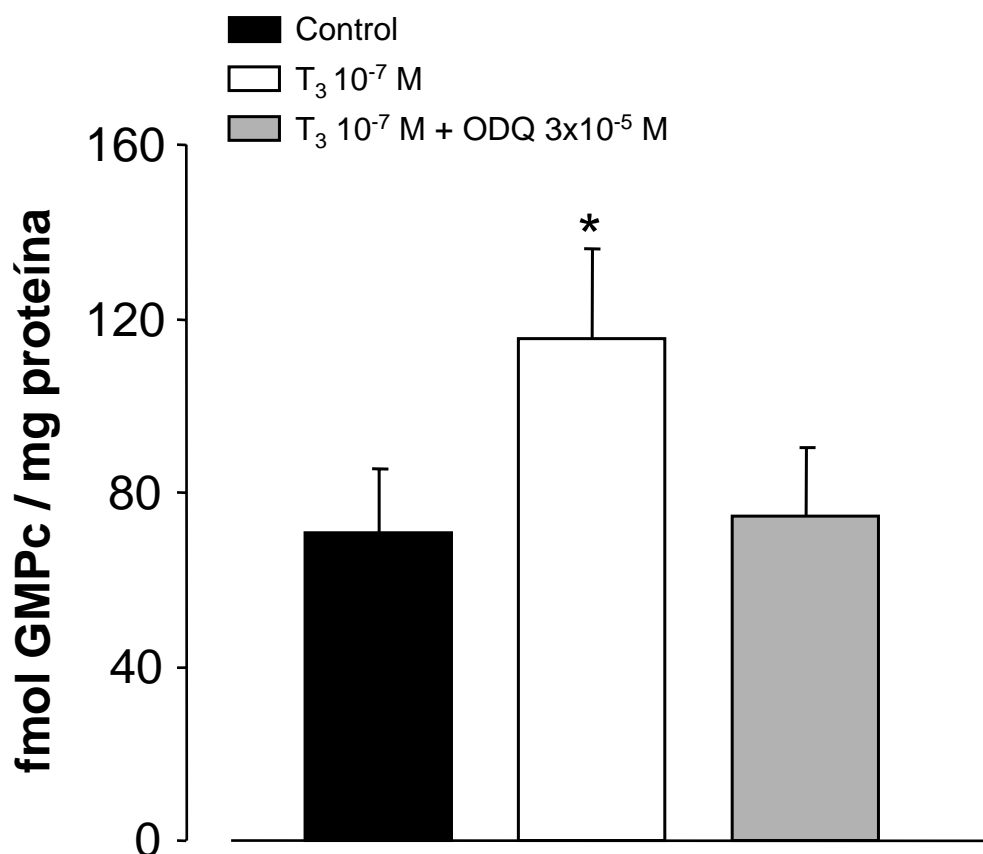


FIGURA 11. Valores medios de los niveles de GMPC expresados en fmol GMPC mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃ (10⁻⁷ M) y la combinación de T₃ más ODQ. **P*<0.05 comparados con el control.

VENA SAFENA HUMANA

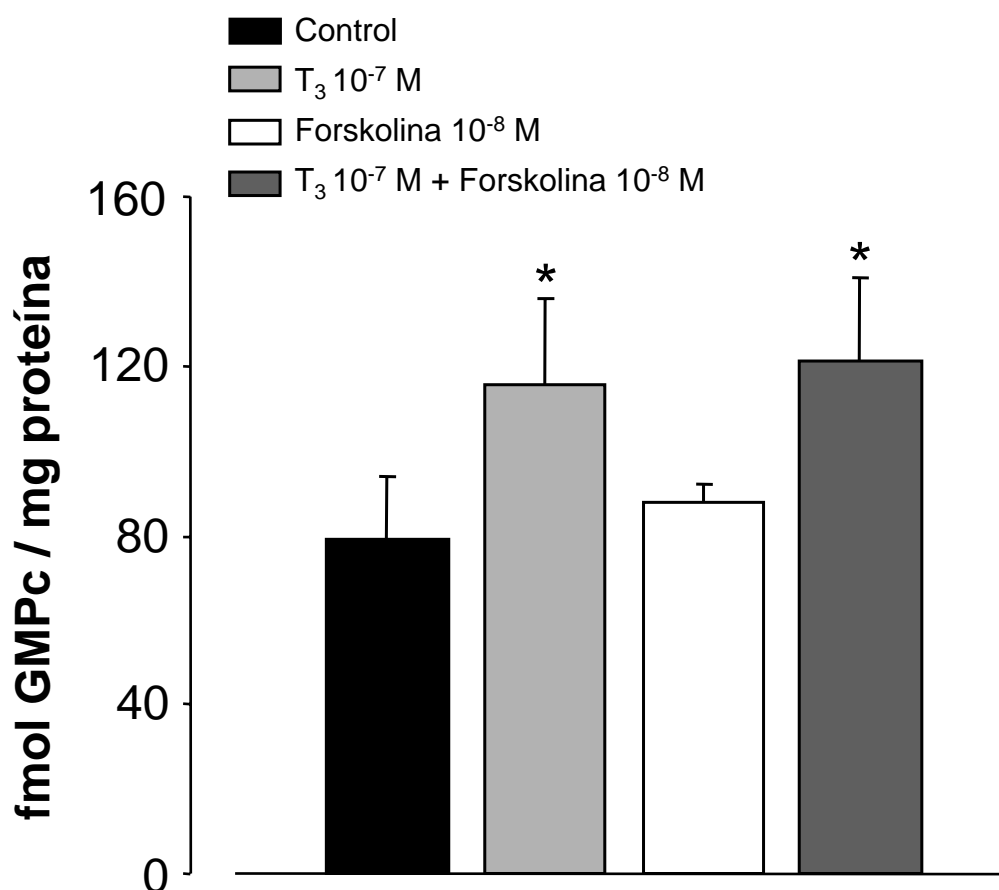


FIGURA 12. Valores medios de los niveles de cGMP expresados en fmol cGMP mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃ (10⁻⁷ M), forskolina (10⁻⁸ M) o de la combinación de T₃ (10⁻⁷ M) más forskolina (10⁻⁸ M). **P*<0.05 comparados con el control.

produjo un incremento significativo del contenido de AMPc (*Figura 13, Tabla 4*). El tratamiento con T₃ no modificó ($P>0.05$) el incremento de AMPc producido por la forskolina.

Conjuntamente estos resultados indican que la respuesta relajante de la vena safena humana a la T₃ estaría mediada, al menos en parte, por la activación de la guanilato ciclasa que incrementaría los niveles de GMPc en el músculo liso y descartarían la participación de la adenilato ciclasa y AMPc en la respuesta relajante a la T₃.

Participación de las sustancias prostanoides y del óxido nítrico en la respuesta a la T₃

La indometacina (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante inducida por la T₃ (*Figura 14*). No se observaron diferencias entre las curvas concentración-respuesta control y aquellas a las que se les administró indometacina, lo que excluiría la participación de sustancias prostanoides relajantes, a través de la activación de la ciclooxigenasa, en la relajación de la vena safena producida por la T₃.

La adición al baño de órganos de L-NMMA (3×10^{-4} M), inhibidor de la síntesis de NO, no modificó la respuesta relajante a la T₃ (*Figura 15*). Estos resultados descartarían al óxido nítrico como responsable de dicha relajación.

VENA SAFENA HUMANA

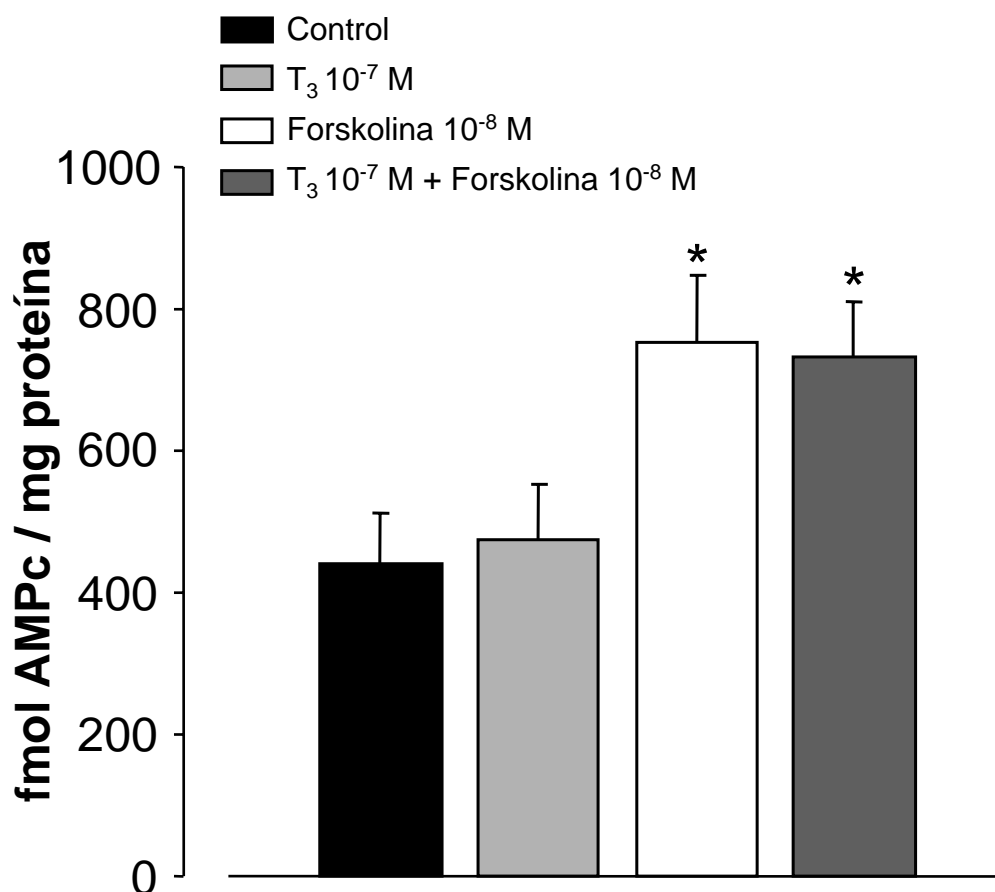


FIGURA 13. Valores medios de los niveles de AMPc expresados en fmol AMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación de T₃ (10⁻⁷ M), forskolina (10⁻⁸ M) o de la combinación de T₃ (10⁻⁷ M) más forskolina (10⁻⁸ M). **P*<0.05 comparados con el control.

TABLA 4. Valores medios de los niveles de AMPc expresados en fmol AMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃, forskolina o de la combinación de T₃ más forskolina.

	n	fmol AMPc mg⁻¹ proteína
Control	8	442 ± 50
T ₃ (10 ⁻⁷ M)	8	475 ± 62
Forskolina (10 ⁻⁸ M)	8	753 ± 76*
T ₃ (10 ⁻⁷ M) + Forskolina (10 ⁻⁸ M)	8	731 ± 78*

n, número de pacientes. **P*<0.05 comparados con el control.

VENA SAFENA HUMANA

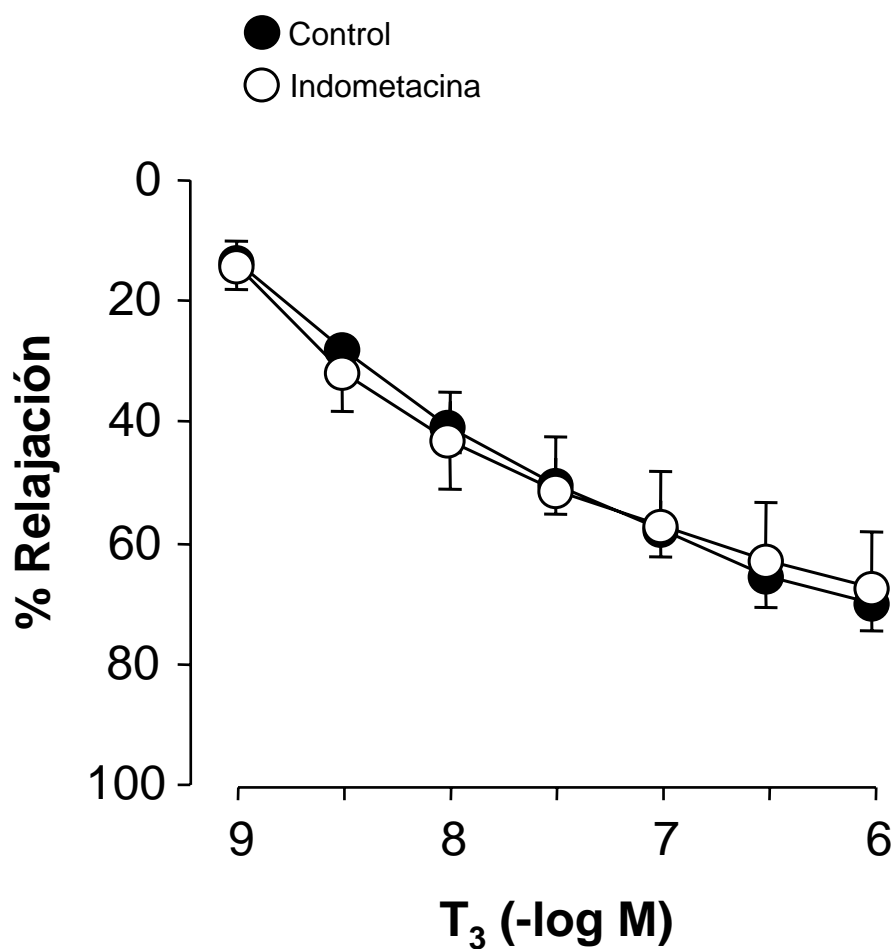


FIGURA 14. Respuesta a la T₃ en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10⁻⁵ M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

VENA SAFENA HUMANA

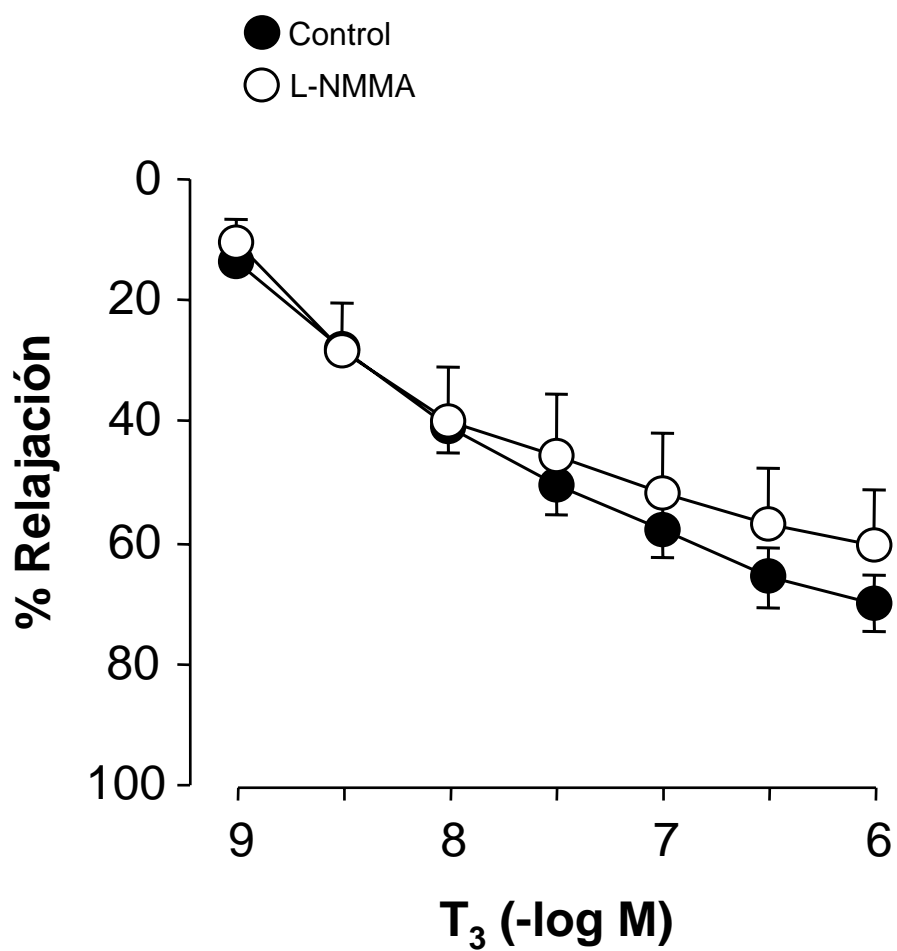


FIGURA 15. Respuesta a la T_3 en ausencia (control) y en presencia de L-NMMA (3×10^{-4} M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

Por último, el tratamiento conjunto con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (3×10^{-4}) no modificó la relajación inducida por la T_3 en vena safena humana (*Figura 16*). Estos resultados sugieren la ausencia de mecanismos compensadores entre el NO y prostaciclina en la respuesta relajante a la T_3 en la vena safena humana.

Participación de los canales de K^+ y la Na^+K^+ -ATPasa en la respuesta a la T_3

En segmentos venosos incubados con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (3×10^{-4} M) y contraídos con noradrenalina, la presencia de charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M), combinación que bloquea los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , no modificó la respuesta relajante a la T_3 en anillos de vena safena (*Figura 17*). Estos resultados descartarían la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} en la respuesta relajante inducida por la T_3 .

La ouabaina (10^{-3} M), un inhibidor de la Na^+K^+ -ATPasa, inhibió la relajación máxima a la T_3 aproximadamente un 36% sin modificar la CE_{50} (*Figura 18*). Para comprobar si la relajación remanente estaba mediada por los canales de K^+ rectificadores de entrada, segmentos de vena safena humana se incubaron en presencia de $BaCl_2$. La combinación de ouabaína (10^{-3} M) más $BaCl_2$ (10^{-6} M) inhibió la respuesta relajante inducida por T_3 (*Figura 18*). Estos resultados

VENA SAFENA HUMANA

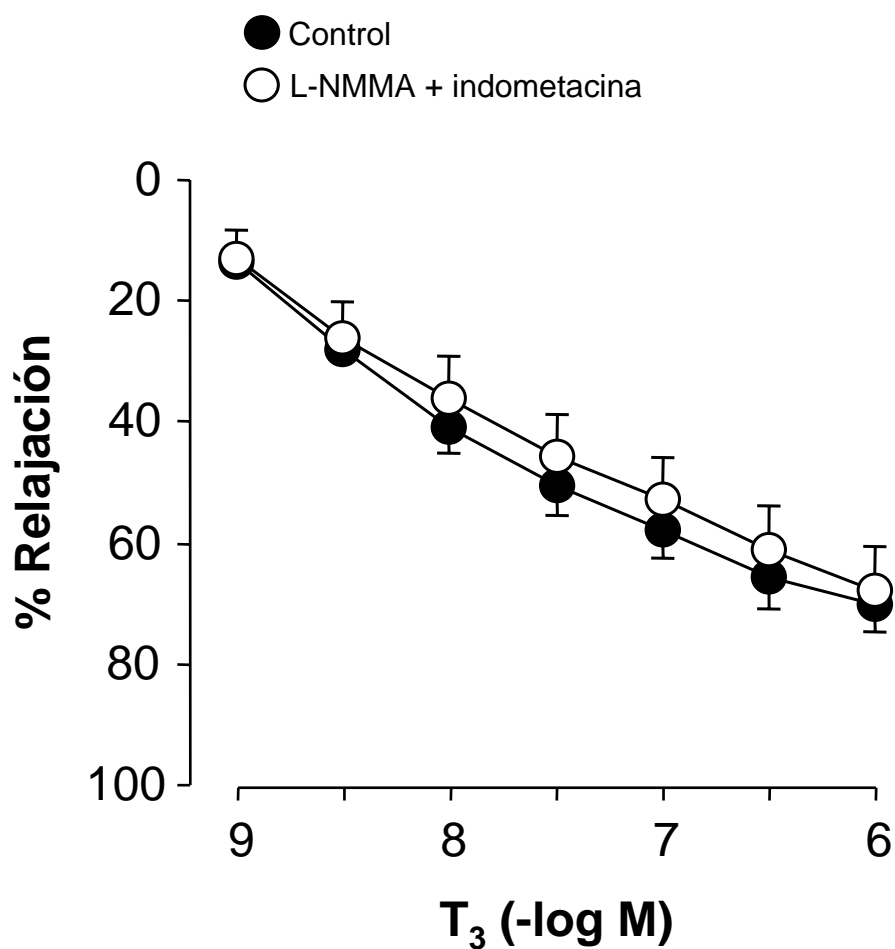


FIGURA 16. Respuesta a la T₃ en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10⁻⁵ M) más L-NMMA (3x10⁻⁴ M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

VENA SAFENA HUMANA

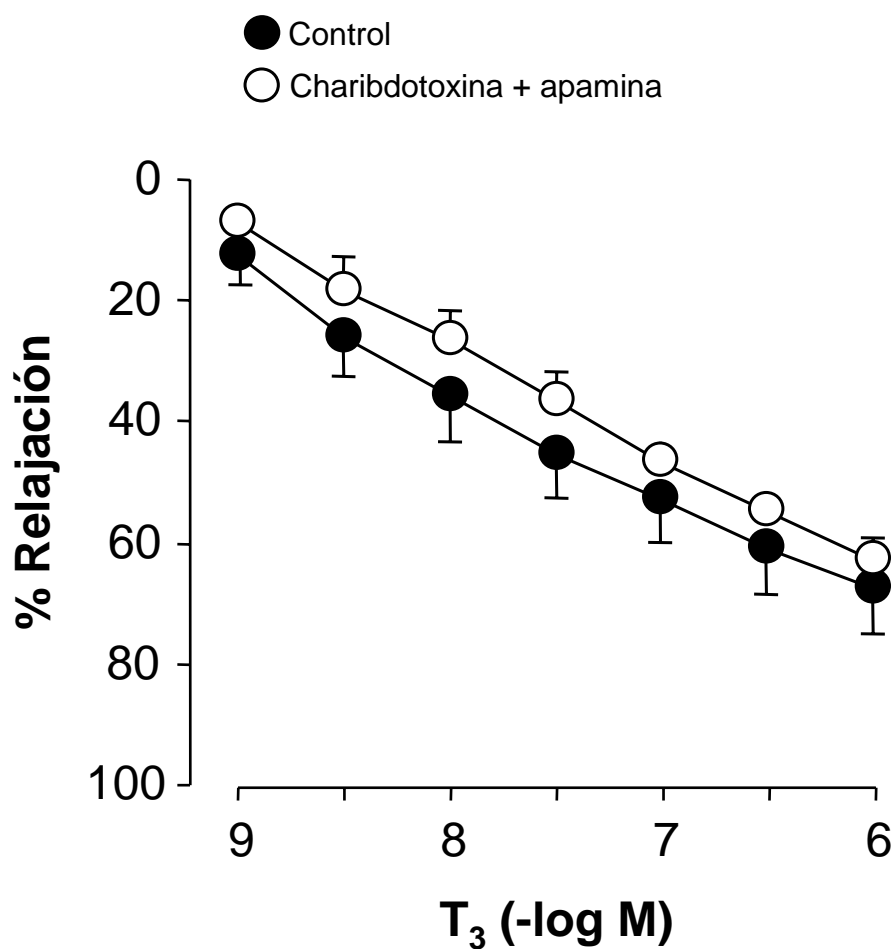


FIGURA 17. Respuesta a la T₃ en presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (3×10^{-4} M). Los experimentos se realizaron en ausencia (control) y en presencia de charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

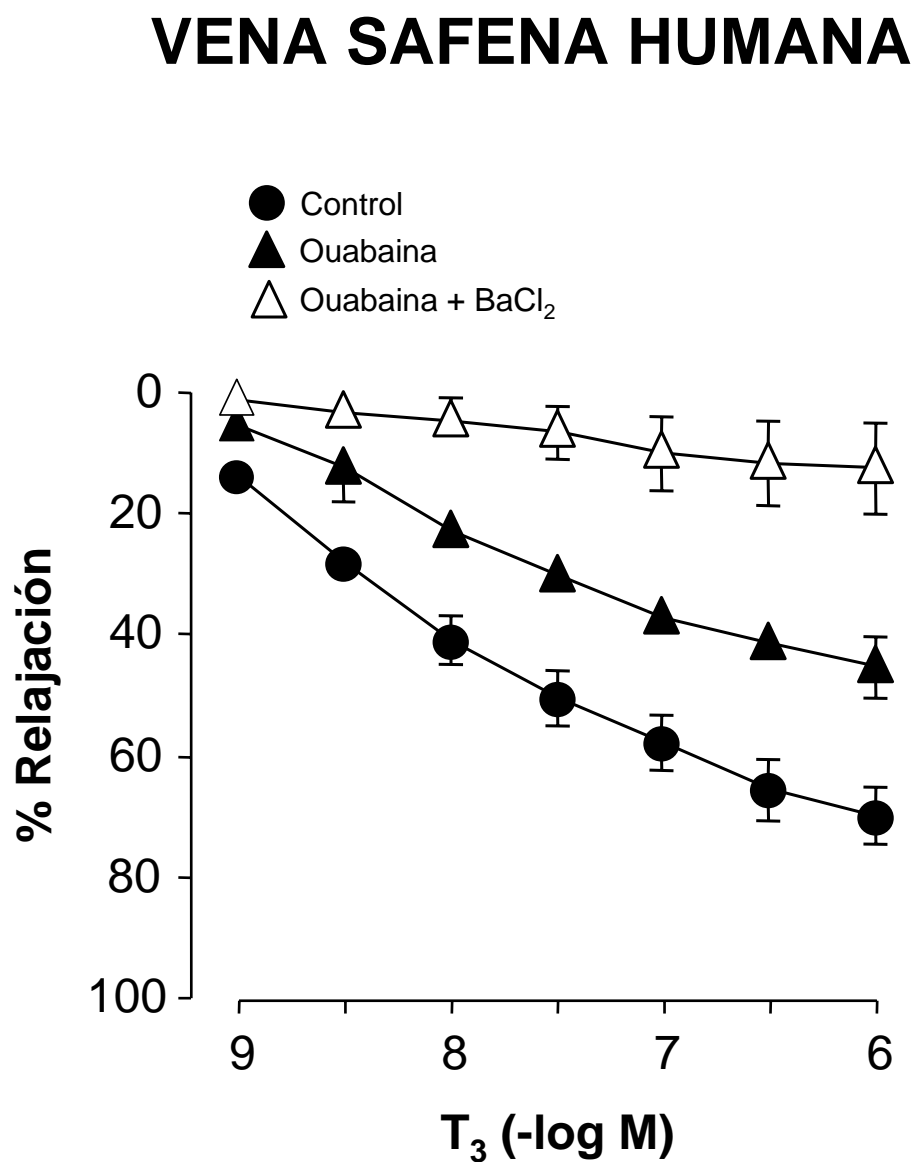


FIGURA 18. Respuesta a la T₃ en ausencia (control) y en presencia de ouabaina (10⁻³ M) u ouabaina (10⁻³ M) más BaCl₂ (10⁻⁶ M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

sugieren que la T_3 produciría relajación de la pared vascular de la vena safena por mecanismos que implican la activación de la Na^+,K^+ -ATPasa y de los canales de K^+ rectificadores de entrada.

La *Tabla 5* recoge el valor medio de la CE_{50} y el efecto máximo de las curvas concentración respuesta a la T_3 en las distintas condiciones experimentales.

Respuesta al nitroprusiato sódico

En anillos con y sin endotelio, el nitroprusiato sódico (10^{-11} - 10^{-7} M) produjo una relajación completa (100%) de los anillos previamente contraídos, con un valor de CE_{50} de 4.4×10^{-9} M (*Figura 19*). La adición de T_3 (10^{-7} M) no modificó ($P > 0.05$) la relajación inducida por el nitroprusiato sódico. En segmentos de vena safena la adición de nitroprusiato sódico incrementó significativamente los niveles basales de GMPc y la adición de T_3 no modificó ($P > 0.05$) significativamente el incremento de la concentración de GMPc inducido por el nitroprusiato sódico (*Figura 20*). Por otra parte el nitroprusiato sódico sólo o en combinación con T_3 no modificó los niveles basales de AMPc (*Figura 21*).

TABLA 5. Valores de la concentración eficaz 50 (CE_{50} , M), su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y del efecto máximo (E_{max} , relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina), \pm error estándar (e.e.) de las curvas concentración-respuesta a la T_3 en ausencia (control) y en presencia de los distintos inhibidores y bloqueantes.

T_3	n	EC_{50} (IC 95%)	$E_{m\acute{a}x} \pm e.e$ (% Relajaci3n)
Control	10	6.5×10^{-9} ($4.6 \times 10^{-9} - 9.2 \times 10^{-9}$)	70 ± 5
Indo (10^{-5} M)	6	5.7×10^{-9} ($3.1 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-8}$)	67 ± 9
L-NMMA (3×10^{-4} M)	6	4.6×10^{-9} ($3.1 \times 10^{-9} - 6.7 \times 10^{-8}$)	60 ± 9
Indo (10^{-5} M) + L-NMMA (3×10^{-4} M)	6	9.2×10^{-9} ($3.8 \times 10^{-9} - 2.2 \times 10^{-8}$)	68 ± 7
Indo (10^{-5} M) + L-NMMA (3×10^{-4} M) + ChTx (10^{-7} M) + Apa (10^{-6} M)	6	1.5×10^{-8} ($6.6 \times 10^{-9} - 3.3 \times 10^{-8}$)	63 ± 4
Ouabaína (10^{-3} M)	6	8.9×10^{-9} ($2.0 \times 10^{-9} - 3.9 \times 10^{-8}$)	63 ± 4
Ouabaína (10^{-3} M) + BaCl ₂ (10^{-6} M)	6	#	$9 \pm 6^*$

Indometacina (Indo); charibdotoxina (ChTx), apamina (Apa).

n número de pacientes. * $P < 0.05$ comparados con el control.

El valor de la concentración eficaz 50 (CE_{50}) no se calculó debido a que la relajación máxima inducida por la T_3 fue menor del 10%

VENA SAFENA HUMANA

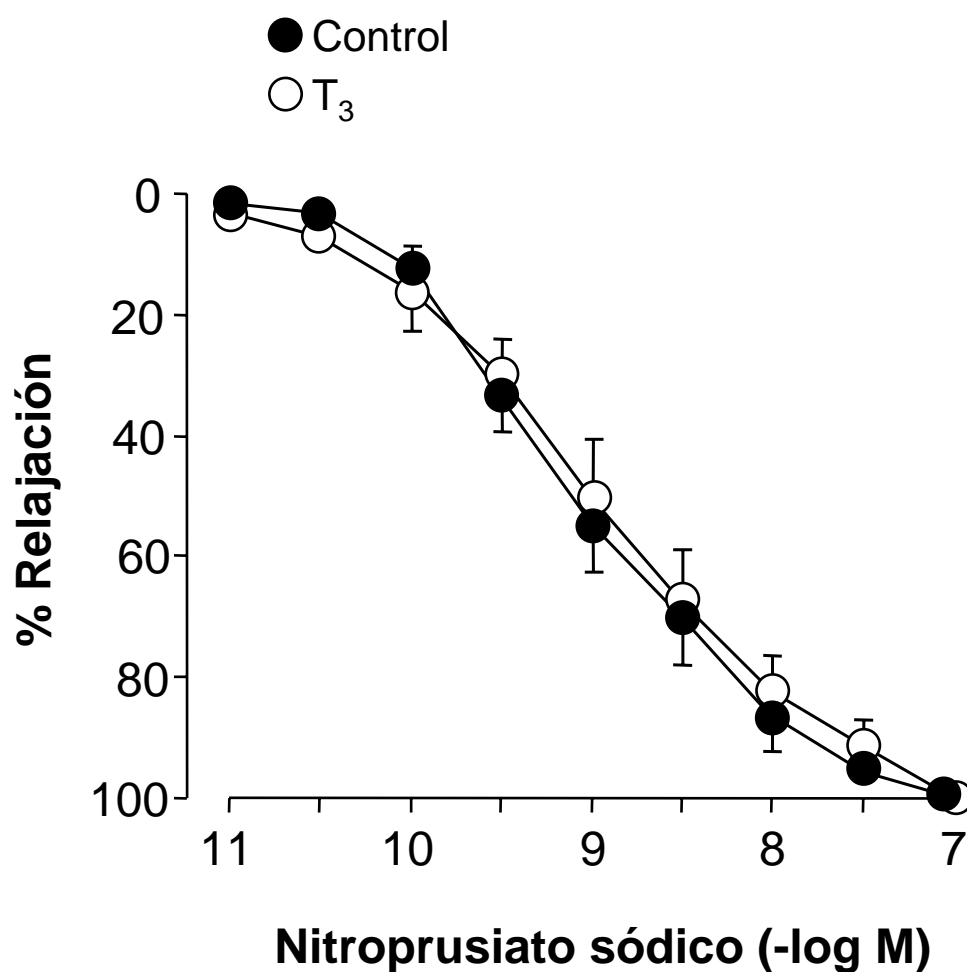


FIGURA 19. Respuesta al nitroprusiato sódico en ausencia (control) y en presencia de T₃ (10⁻⁷ M). Venas previamente contraídas con noradrenalina.

VENA SAFENA HUMANA

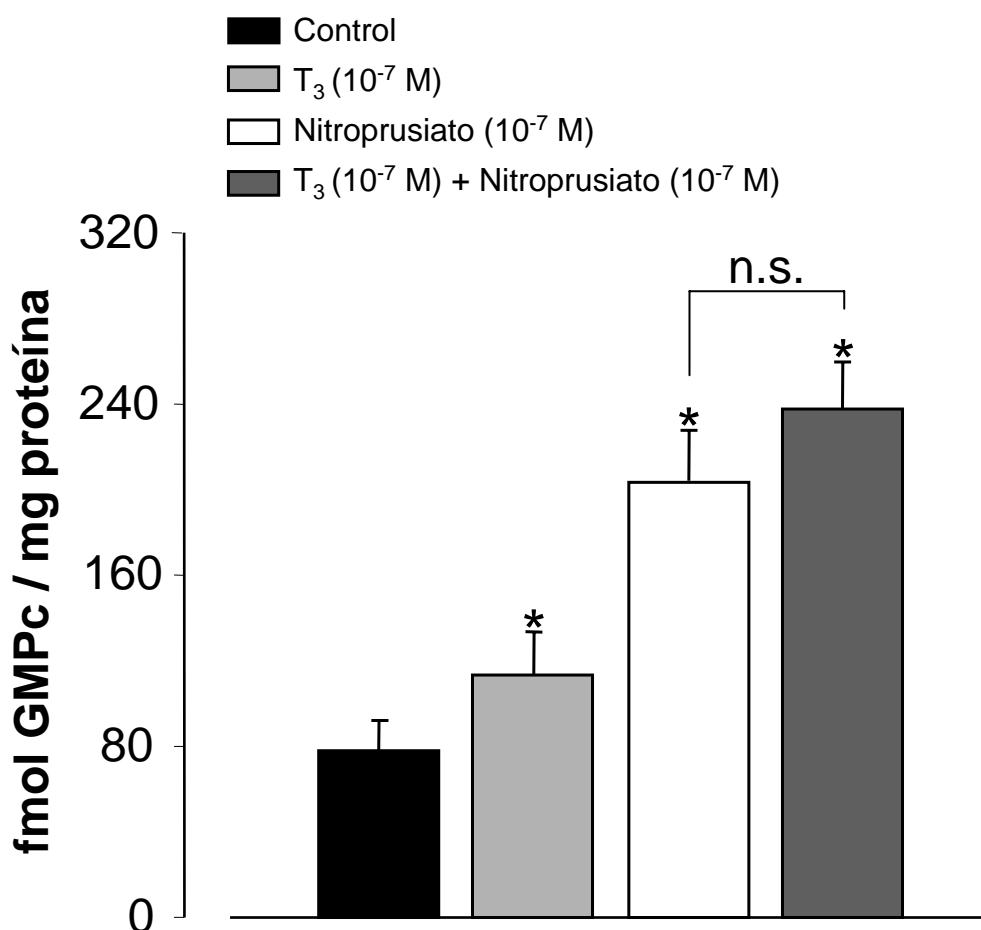


Figura 20. Valores medios de los niveles de GMPc expresados en fmol GMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃ (10⁻⁷ M), nitroprusiato sódico (NPS, 10⁻⁷ M) o de la combinación de T₃ (10⁻⁷ M) más NPS (10⁻⁷ M). *n.s.* no significativo, **P*<0.05 comparados con el control.

VENA SAFENA HUMANA

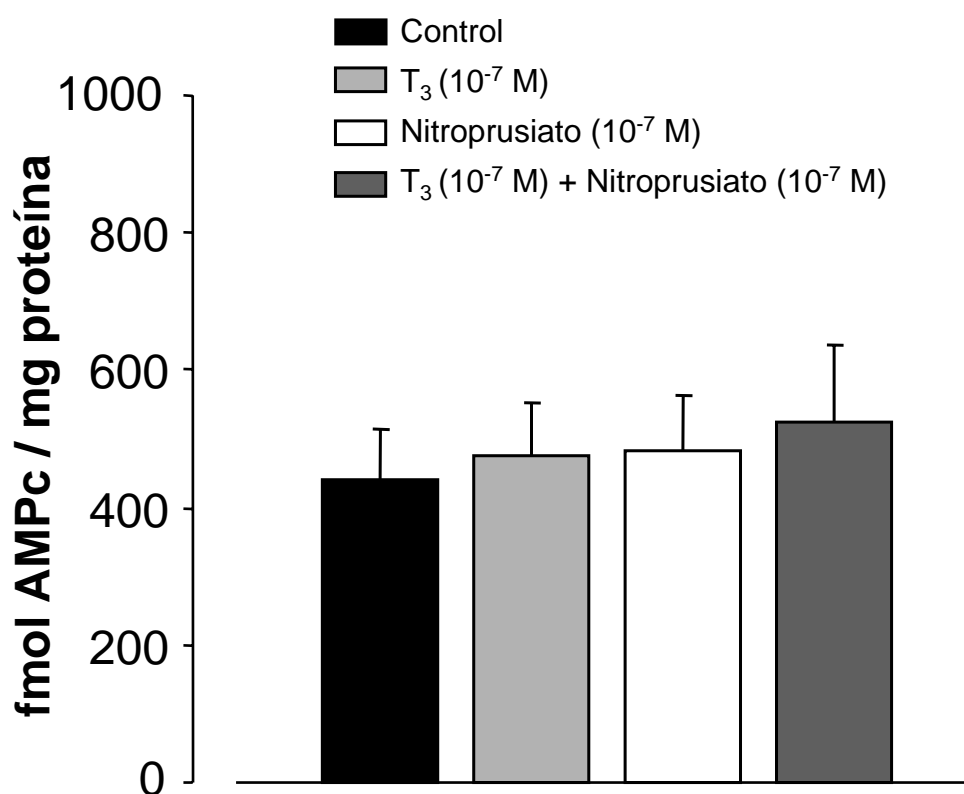


Figura 21. Valores medios de los niveles de AMPc expresados en fmol AMPc mg⁻¹ proteína en condiciones control, tras la incubación con T₃ (10⁻⁷ M), nitroprusiato sódico (NPS, 10⁻⁷ M) o de la combinación de T₃ (10⁻⁷ M) más NPS (10⁻⁷ M).

DISCUSIÓN

En la vena safena la administración de T₄ y T₃ produjo relajación del músculo liso vascular similar a la observada en otros vasos de conducción,¹¹⁵ en arterias de resistencia^{117;118} y en cultivos de células de músculo liso.¹¹⁶

El músculo liso determina el tono vascular, por lo que la T₃ participaría directamente en la regulación de la resistencia vascular, que a su vez produciría alteraciones en la presión venosa, así como en el gasto cardíaco.^{123;152-154} Se ha demostrado que en el hipotiroidismo hay un descenso del 50% en la resistencia vascular sistémica.^{155;156} Sin embargo, el hipertiroidismo tiene poco efecto sobre la presión arterial media ya que el aumento en la presión sistólica producido por el aumento en el volumen de eyección, está compensado por un descenso en la presión diastólica mediante vasodilatación periférica.^{157;158} Por el contrario, el hipotiroidismo se asocia a descensos en la presión diastólica.¹⁵⁹

La T₄ ejerce sus efectos biológicos al ser convertida a T₃ por la yodotironina de yodinasas.^{95;96} Diversos estudios han demostrado la presencia y actividad de la yodotironina de yodinasas tipo 2¹⁶⁰ en las células de músculo liso vascular.⁹³ La T₄ produce relajación de la vena safena humana, sugiriendo la presencia de la yodotironina de yodinasas en la pared de la vena safena. Una respuesta relajante similar a la T₄ se ha observado en arteriolas del músculo esquelético de rata.¹¹⁷

La actividad de la enzima, está controlada por la concentración de T_4 y T_3 .¹⁶¹⁻¹⁶³ La T_4 suprime la actividad de la yodotironina de yodinasa al acelerar su propia degradación.¹⁶⁴ Por el contrario, la T_3 suprime la actividad de la de yodinasa al disminuir el ARNm para la formación de la enzima, sin modificar la vida media de la ya formada.¹⁶³

Por tanto la T_4 adicionada al baño de órganos como la T_3 formada a partir de esta en la pared vascular, disminuyen la actividad de la yodotironina de yodinasa produciendo una menor conversión de T_3 responsable de la menor relajación de los segmentos de la vena a la T_4 cuando se comparan con la de la T_3 .

El endotelio vascular, mediante la síntesis y liberación de sustancias relajantes, es el responsable de la vasodilatación inducida por diversas sustancias.¹⁹ El endotelio de la vena safena humana produce PGI_2 ,^{165;166} óxido nítrico¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ y EDHF.¹⁷⁰ Los efectos vasorrelajantes de la T_3 sobre la vena podrían estar mediados por alguna o la combinación de algunas de las sustancias citadas anteriormente.

En la vena safena humana la relajación inducida por la T_4 y T_3 no depende de la presencia de una capa endotelial intacta por lo que no parece que la capa íntima participe en la respuesta a la T_4 y T_3 . En cuanto al papel que desempeña el endotelio en la respuesta vascular a la T_3 los resultados son dispares. Por una parte, se ha demostrado que

la T₃ induce relajación dependiente de la presencia de endotelio^{117;118} mediada por el óxido nítrico¹¹⁸ o por la combinación de PGI₂, óxido nítrico y EDHF.¹¹⁷ Otros estudios demuestran una respuesta vasorrelajante a la T₃ independiente de la presencia de endotelio.^{115;116} Estos resultados sugieren que los mecanismos implicados en la respuesta relajante a la T₃ son diferentes en los diversos lechos vasculares estudiados (vasos de conducción *versus* vasos de resistencia) y entre diferentes especies.

Estímulos tales como hormonas, autacoides y otras sustancias aumentan la biosíntesis de PGI₂ mediante la interacción con receptores localizados en la membrana de las células endoteliales. Nuestros resultados en la vena safena, demuestran que el bloqueo de la producción de PGI₂ con indometacina no modifica la relajación inducida por la T₃ lo que descartaría la participación de la PGI₂ en los efectos relajantes de la T₃.

La administración intraperitoneal de hormona tiroidea a ratas durante 14 días para inducir hipertiroidismo produjo un incremento de la liberación de PGI₂ en anillos de aorta y aumento de los niveles plasmáticos de PGI₂ cuando se comparaba con ratas eutiroideas control. Sin embargo la adición *in vitro* de hormona tiroidea a segmentos de aorta de ratas control no modificó la liberación de PGI₂ sugiriendo que los efectos de la hormona tiroidea sobre la síntesis de PGI₂ sólo ocurren *in vivo*.¹⁷¹

El óxido nítrico es sintetizado en el endotelio vascular a partir de la L-arginina,³³ reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa. Una posibilidad es que la T₃ pudiera inducir la síntesis de óxido nítrico endotelial que difundiría rápidamente hacia el músculo liso subyacente y activaría la guanilato ciclasa. Un estudio reciente demuestra que en pacientes hipertiroideos existe un aumento de la síntesis y liberación de óxido nítrico responsable de la marcada vasodilatación^{122;123} y del incremento del flujo sanguíneo del antebrazo.¹²³ Por otra parte, en diversos tejidos de ratas hipertiroideas se ha demostrado un incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa.^{124;125}

En segmentos de vena safena humana la inhibición de la síntesis de óxido nítrico con L-NMMA no modificó la respuesta vasorrelajante a la T₃. Estos resultados descartan al óxido nítrico como mediador de la respuesta relajante a la T₃ y discrepa con los resultados obtenidos en arteriolas de resistencia de rata¹¹⁷ y hamster¹¹⁸ donde la T₃ produce relajación al estimular la síntesis y liberación de óxido nítrico.

Las diferencias en las respuestas observadas, podrían deberse a que la T₃ induzca relajación por mecanismos diferentes en distintos lechos vasculares. Otra posibilidad es que óxido nítrico y PGI₂ podrían actuar de forma coordinada, de tal forma que cuando se inhibe la producción de óxido nítrico la T₃ relajaría al estimular la síntesis de PGI₂ y viceversa. Para descartar esta probabilidad se realizaron

experimentos en presencia de L-NMMA e indometacina para inhibir la síntesis de óxido nítrico y prostaciclina. En estas condiciones no se modificó la respuesta relajante a la T₃ descartando una participación simultánea y coordinada de NO y PGI₂ en la respuesta relajante a la T₃ en la vena safena humana.

Diversos tipos de canales de K⁺ se encuentran en las células de músculo liso y endotelio vascular. Por ejemplo los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, de voltaje y de ATP y los canales de K⁺ rectificadores de entrada.¹⁷² Los canales de K⁺ participan en la génesis y regulación del potencial de membrana en reposo. Se ha demostrado que los canales de K⁺ sensibles a Ca²⁺ presentes en el músculo liso de la vena safena humana contribuyen de forma significativa a mantener el potencial de membrana en reposo y por lo tanto en la regulación del tono vascular.¹⁷³

La relajación vascular dependiente del endotelio e independiente de óxido nítrico y PGI₂ se ha atribuido al EDHF.^{174;175} Aunque la naturaleza de este factor es desconocida, algunos estudios indican que este factor induce hiperpolarización al aumentar la conductancia de los iones K⁺ a través de la membrana del músculo liso.¹⁷⁶ En algunos estudios se ha sugerido que el factor hiperpolarizante derivado del endotelio podría ser K⁺.⁶⁹ La liberación de K⁺ endotelial se produciría como consecuencia de la apertura de canales K⁺ dependientes de Ca²⁺ por diversos agonistas.¹⁷⁷ El acúmulo de K⁺ en el espacio subendotelial

abriría diversos canales de K^+ en el propio músculo liso⁶⁹ y produciría hiperpolarización del mismo. En diversos lechos vasculares humanos, la relajación producida por el EDHF implica la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} sensibles a la charibdotoxina y apamina.^{178;179}

En nuestros experimentos en la vena safena humana para estudiar la respuesta independiente de óxido nítrico y PGI_2 , los segmentos se incubaron con indometacina más L-NMMA, para inhibir la síntesis y liberación de PGI_2 y óxido nítrico. En estas condiciones el bloqueo de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} con charibdotoxina y apamina no modificó la relajación inducida por la T_3 . Estos resultados descartan a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} en el efecto relajante inducido por la T_3 .

La relajación vascular inducida por la T_3 podría estar relacionada con cambios en la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa de la membrana celular del músculo liso. Se ha demostrado que la actividad de esta bomba iónica aumenta por acción de la T_3 .^{180;181} La ouabaína tiene un marcado efecto inhibitor sobre la Na^+,K^+ -ATPasa. En nuestros experimentos segmentos de vena safena humana, la ouabaína produjo una inhibición de la vasorrelajación inducida por la T_3 . Esta relajación inducida por la T_3 y mediada por la Na^+,K^+ -ATPasa podría deberse a la hiperpolarización de la membrana del músculo liso, con la consiguiente inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la

disminución de Na^+ intracelular que inhibiría la actividad del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ en la membrana.¹⁸²

La Na^+,K^+ -ATPasa junto con los canales de K^+ rectificadores de entrada juegan un papel importante en el control del potencial de membrana de las células de músculo liso vascular y del tono vascular. La T_3 posee efectos agudos sobre los canales de K^+ rectificadores de entrada en miocitos ventriculares de cobayo.¹⁸³ Para estudiar la participación de estos canales se utilizó el BaCl_2 un inhibidor de estos canales previa adición de ouabaína para descartar un efecto compensador de la Na^+,K^+ -ATPasa. En estas condiciones se inhibió completamente la respuesta relajante a la T_3 indicando que en la vena safena humana la respuesta relajante a la T_3 sería debida a la activación de la Na^+,K^+ -ATPasa y de los canales de K^+ rectificadores de entrada.

Con la finalidad de determinar si la T_3 puede alterar la respuesta independiente de la presencia de endotelio, se estudió la relajación inducida por el nitroprusiato sódico. El nitroprusiato sódico relaja el músculo liso liberando óxido nítrico en las células musculares lisas y por tanto la integridad del endotelio no es un factor determinante en sus efectos vasculares.^{184 185} En venas safenas humanas la relajación del nitroprusiato sódico no fue alterada por la T_3 . Por tanto nuestros resultados sugieren que la T_3 no altera la relajación independiente de la presencia de endotelio.

Diversas sustancias vasoactivas actúan a través de receptores de membrana que median sus efectos al incrementar los niveles plasmáticos de nucleótidos cíclicos, GMPc y AMPc.^{186;187} Se ha demostrado la presencia de lugares de unión de alta afinidad para la T₃ en la membrana plasmática de células de músculo liso vascular.¹¹⁶ Se han identificado lugares de unión para la T₃ en la membrana plasmática de hepatocitos,¹⁸⁸ timocitos,¹⁸⁹ fibroblastos,¹⁹⁰ y proteínas citosólicas de unión a T₃ en células de hígado¹⁹¹ y cerebro.¹⁹² Si las moléculas de unión para la T₃ localizadas en la membrana plasmática de las células de músculo liso vascular funcionan únicamente como transportadores de membrana o si además inician una señal intracelular responsable de sus efectos agudos es una cuestión que todavía debe ser determinada.

En nuestros experimentos en la vena safena, la T₃ induce un aumento de los niveles de GMPc de forma concentración dependiente. El GMPc produce relajación de las células de músculo liso vascular^{193;194} al producir la activación de la protein kinasa dependiente de GMPc (PKG).^{195;196} Se ha demostrado que el GMPc reduce los niveles intracelulares de Ca²⁺ libre al estimular la Ca²⁺-ATPasa, produce la apertura de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ induciendo hiperpolarización y produce la inhibición de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje.^{195;197} La concentración de GMPc está controlada a través de su síntesis por la guanilato ciclase y su hidrólisis a guanosina 5'-monofosfato (GMP) a través de las fosfodiesterasas.¹⁹⁸ Los

experimentos se realizaron en presencia de IBMX, un inhibidor inespecífico de las fosfodiesterasas¹⁴⁴ para descartar que el aumento del GMPc, fuera debido a una disminución en su degradación.

En la vena safena humana la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ disminuyó la relajación inducida por la T₃ e inhibió el incremento de los niveles de GMPc en respuesta a la T₃. Estos resultados demuestran que la T₃ produce de forma rápida una activación de la guanilato ciclasa y un incremento de la producción de GMPc.

En la vena safena humana el nitroprusiato sódico produce un aumento significativo de los niveles basales de GMPc. El nitroprusiato sódico libera óxido nítrico en el músculo liso donde activa a la guanilato ciclasa e incrementa los niveles de GMPc.¹⁹³ La T₃ podría interactuar con otras sustancias vasoactivas que activan la guanilato ciclasa potenciando sus efectos. En nuestros experimentos la presencia conjunta de T₃ y nitroprusiato sódico no produce una potenciación del acumulo de GMPc.

A pesar de que el AMPc y el GMPc tienen efectos antagónicos en la mayoría de los tejidos,¹⁹⁹ en el músculo liso vascular ambos producen relajación.²⁰⁰⁻²⁰³ Existen reacciones cruzadas entre AMPc y GMPc de forma que el AMPc estimula la PKG^{204;205} y el GMPc estimula la protein kinasa dependiente de AMPc (PKA).²⁰⁶ Por otra parte,

sustancias vasodilatadoras que aumentan los niveles de GMPc podrían aumentar los de AMPc produciendo una respuesta sinérgica. En la vena safena humana, el nitroprusiato sódico no modificó los niveles de AMPc ni la forskolina los de GMPc, descartando la existencia de reacciones cruzadas entre los dos nucleótidos cíclicos.^{203;204}

Agentes que producen relajación del músculo liso vascular mediante la activación de la adenilato ciclasa, como la forskolina, provocan sus efectos mediante el aumento de la concentración de AMPc.^{202;207;208} El AMPc produce relajación vascular, a través de la activación de la PKA.^{207;209;210} En la vena safena humana, la forskolina incrementa los niveles de AMPc. Sin embargo la T₃ no modifica los niveles de AMPc. Estos resultados descartarían la participación del AMPc en el mecanismo de acción de los efectos vasculares de la hormona tiroidea. La administración conjunta de forskolina y T₃ no altera los niveles de AMPc lo que descarta una interacción de la T₃ con sustancias que activan la adenilato ciclasa.

Consideraciones finales

La regulación neurohumoral, presente en el individuo sano o enfermo, está ausente en el vaso aislado. Por este motivo, cualquier experimento *in vitro* relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*.

Los mecanismos de adaptación que pueden aparecer en el sujeto enfermo sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones circunscritas al órgano efector que es la propia pared vascular. Sin embargo, el estudio de la respuesta del órgano efector continúa siendo uno de los objetivos primordiales para conocer los fundamentos de las alteraciones vasculares en el bypass coronario. Este objetivo ha sido sistemáticamente inalcanzable en los estudios *in vivo* por limitaciones éticas y las derivadas del procedimiento experimental en el enfermo. Precisamente la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares en los estudios clínicos constituye casi siempre una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano efector de forma experimental o cuando se pretende estudiar los efectos de hormonas o sustancias que afectan diversos órganos de forma simultánea y coordinada.

En el presente trabajo se ha empleado un sistema de medida de tensión isométrica que permite una gran sensibilidad en segmentos vasculares cilíndricos (anillos). Al introducir dos alambres metálicos finos en la luz del anillo vascular, conectados a un transductor de fuerza, las medidas reflejan los cambios de tensión a lo largo del eje mayor de las fibras musculares lisas circulares. Es conveniente utilizar anillos vasculares libres de ramificaciones debido a la posible disposición irregular de las fibras musculares lisas en estas zonas. Esto no supone una limitación rigurosa, ya que a pocos milímetros de

distancia de las ramificaciones se conserva la disposición normal de las fibras circulares.

Muchos de los efectos celulares de la hormona tiroidea están mediados por la unión de esta a distintos receptores proteicos nucleares que regulan la transcripción de genes específicos.²¹¹ Estos efectos genómicos requieren necesariamente un periodo de tiempo para la síntesis de proteínas y para poner de manifiesto la respuesta biológica. Por el contrario, la rapidez con que la T₃ incrementa los niveles de GMPc así como la rapidez con que produce la relajación vascular, similar a la de otros agentes vasorrelajantes como el nitroprusiato sódico, sugiere que en estos efectos de la T₃, no participarían mecanismos de transcripción génica.

El mecanismo por el que las concentraciones plasmáticas de T₃ disminuyen en pacientes a los que se les ha realizado una cirugía cardíaca no se conoce, pero está probablemente asociado con la hipotermia, hemodilución y la activación de los mediadores de la respuesta inflamatoria.^{110;212} Se ha demostrado que la administración de T₃ produce efectos hemodinámicos beneficiosos en pacientes a los que se les ha realizado un bypass coronario¹ similares a aquellos que se observan en pacientes hipotiroideos.¹¹⁰

En la regulación *in vivo* de la resistencia vascular sistémica se produce una interacción entre sustancias capaces de alterar directa e

indirectamente el tono del músculo liso. Los efectos *in vivo* de la T₃ podrían también implicar el antagonismo de sustancias vasoconstrictoras endógenas o la potenciación de sustancias vasodilatadoras. Mientras que se han demostrado unos efectos pronunciados de la enfermedad tiroidea sobre el corazón y el sistema circulatorio periférico, algunos resultados recientes sugieren el potencial terapéutico de la hormona tiroidea como agente cardioactivo.^{102;213} Los resultados de nuestro trabajo sugieren que los efectos beneficiosos agudos que podrían surgir de la administración de T₃ en pacientes a los que se les realiza un bypass coronario, serían debidos al menos en parte, por su capacidad para regular el tono del músculo liso vascular mediante el incremento de los niveles de GMPc, activación de la Na⁺,K⁺-ATPasa y de los canales de K⁺ rectificadores de entrada.

CONCLUSIONES

La T_3 y la T_4 producen relajación del músculo liso de la vena safena humana mediada, al menos en parte por la activación de la guanilato ciclasa e incremento de los niveles de GMPc.

La relajación de la vena safena en respuesta a la T_3 es independiente de la presencia o ausencia de endotelio. En los mecanismos por los que la T_3 induce relajación del músculo liso vascular participaría de forma conjunta la activación de la Na^+,K^+ -ATPasa y la activación de los canales de K^+ rectificadores de entrada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klemperer, J. D., Klein, I., Gomez, M., Helm, R. E., Ojamaa, K., Thomas, S. J., Isom, O. W., Krieger, K. (1995) Thyroid hormone treatment after coronary-artery bypass surgery *N.Engl.J Med* **333**, 1522-1527
2. Klein, I. Ojamaa, K. (2001) Thyroid hormone and the cardiovascular system *N Engl J Med* **344**, 501-509
3. Robbins, S. L. (1963) *Tratado de patología.*, Editorial Interamericana S.A.,
4. Bergan, J. J., Yao, J. S. T., Flinn, W. R., Graham, L. M. (1982) Prosthetic grafts for the treatment of lower limb ischemia: Present status *Br.J.Surg.* **69 (Suppl)**, 34-37
5. Sabinston, D. C. J. (1963) Direct surgical management of congenital and acquired lesions of the coronary artery *Prog.Cardiovasc.Dis.* **6**, 299-310
6. Garret, H. E., Dennis, E. W., DeBakey, M. E. (1973) Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-years follow up *JAMA* **223**, 792-794
7. Favaloro, R. G. (1968) Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann Thorac Surg* **5**, 334-339
8. Johnson, W. B., Flemma, R. J., Lepley, D. J., Ellison E.H. (1969) Extended treatment of severe coronary artery disease: A total surgical approach. *Ann Surg* **170**, 460-470
9. Urschel, H. C. J., Miller, E. R., Razzuk, M. A., Alvares, J. F., McNamara, J. J., Paulson, D. L. (1969) Aorta-to-coronary-artery vein bypass graft for coronary artery occlusive disease. *Ann Thorac Surg.* **8**, 114-125
10. von Reclinghausen, F. D. (1862) *Die lymphgefäße und ihre Beziehung zum Bindegewebe*, Berlin
11. Vane, J. R., Änggard, E. E., Botting, R. M. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium *N.Engl.J.Med.* **323**, 27-36
12. Inagami, T. (1995) Endothelium as an endocrine organ *Annu.Rev.Physiol.* **57**, 171-189
13. Moncada, S. Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway *N.Engl.J.Med.* **329**, 2002-2012
14. Prins, G. S. Zanaveld, L. J. D. (1980) Radiographic study of fluid transport in the rabbit vas deferens during sexual rest and after sexual activity *J.Reprod.Fertil.* **58**, 311-319
15. Baumgarten, H. G., Owan, C., Sjoberg, N. O. (1975) Neural mechanisms in male fertility. In Sciara, J. J., editor. *Control of male fertility*, Harper y Row, New York
16. Cooke, J. P. Dzau, V. J. (1997) Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease *Annu Rev Med* **48**, 489-509

17. Thorin, E. Shreeve, S. (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states *Pharmacol.Ther.* **78**, 155-166
18. Furchgott, R. F. Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine *Nature* **288**, 373-376
19. Furchgott, R. F. Vanhoutte, P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors *FASEB J.* **3**, 2007-2018
20. Furchgott, R. F. (1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **24**, 175-197
21. Sjöberg, T., Steen, S., Skärby, T., Norgren, L., Andersson, K. E. (1987) Postjunctional alpha adrenoceptors in human superficial epigastric arteries and veins *Pharmacol.Toxicol.* **60**, 43-50
22. Hynes, M. R., Dang, H., Duckles, S. P. (1988) Contractile responses to adrenergic nerve stimulation are enhanced with removal of endothelium in rat caudal artery *Life Sci.* **42**, 357-365
23. Vila, J., Martin de Aguilera, E., Cuesta, M., Martinez, M., Irurzun, A., Lluch, S. (1989) Endothelium attenuates contractile responses of goat saphenous arteries to adrenergic nerve stimulation *Comp.Biochem.Physiol.* **94C**, 431-434
24. Aldasoro, M., Martínez, C., Vila, J. M., Flor, B., Lluch, S. (1993) Endothelium-dependent component in the contractile responses of human omental arteries to adrenergic stimulation *Eur.J.Pharmacol.* **250**, 103-107
25. Aldasoro, M., Martínez, C., Vila, J. M., Medina, P., Lluch, S. (1996) Influence of endothelial nitric oxide on adrenergic contractile responses of human cerebral arteries *J.Cereb.Blood Flow Metab.* **16**, 623-628
26. Martínez, C., Cases, E., Vila, J. M., Aldasoro, M., Medina, P., Marco, V., Lluch, S. (1995) Influence of endothelial nitric oxide on neurogenic contraction of human pulmonary arteries *Eur.Respir.J.* **8**, 1328-1332
27. Segarra, G., Medina, P., Domenech, C., Martínez-León, J. B., Vila, J. M., Aldasoro, M., Lluch, S. (1998) Neurogenic contraction and relaxation of human penile deep dorsal vein *Br.J.Pharmacol.* **124**, 788-794
28. Fabi, F., Argiolas, L., Chiavarelli, M., Del Basso, P. (1996) Nitric oxide-dependent and -independent modulation of sympathetic vasoconstriction in the human saphenous vein *Eur.J.Pharmacol.* **309**, 41-50
29. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature* **327**, 524-526
30. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those of nitric oxide radical *Circ.Res.* **61**, 866-879

31. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**, 9265-9269
32. Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine *Nature* **333**, 664-666
33. Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation *Biochem.Biophys.Res.Commun* **153**, 1251-1256
34. Sessa, W. (1994) The nitric oxide synthase family of proteins *J.Vasc.Res.* **31**, 131-143
35. Cowley, A. W. (1982) Vasopressin and cardiovascular regulation. In Guyton, A. C. and Hall, J. E., editors. *Cardiovascular Physiology IV*, Univ. Park Press, Baltimore, MD
36. Angus, J. A. Cocks, T. M. (1989) Endothelium-derived relaxing factor *Pharmac.Ther.* **41**, 303-351
37. Ignarro, L. J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **30**, 535-560
38. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S., Chaudhuri, G. (1988) Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: Use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **244**, 181-189
39. Ignarro, L. J. (1989) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein *Circ.Res.* **65**, 1-21
40. Waldman, S. Murad, F. (1988) Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system *J Cardiovasc Pharmacol.* **12**, S115-S118
41. Palmer, R. M. S. Moncada, S. (1989) A novel citruline forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells *Biochem.Biophys.Res.Commun* **158**, 348-352
42. Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Hodson, H. F., Moncada, S. (1989) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation *Br.J.Pharmacol.* **96**, 418-424
43. Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, H. F., Moncada, S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo *Br.J.Pharmacol.* **101**, 746-752
44. Simonsen, U., Prieto, D., Sáenz de Tejada, I., García-Sacristán, A. (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission

- of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K⁺-channels
Br.J.Pharmacol. **116**, 2582-2590
45. Holmquist, F., Hedlund, H., Andersson, K. E. (1992) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man
J.Physiol.(Lond.) **449**, 295-311
 46. Porst, H. (1993) Prostaglandin E1 and the nitric oxide donor linsidomine for erectile failure: a diagnostic comparative study of 40 patients *J.Urol.* **149**, 1280-1283
 47. Wang, R., Domer, F. R., Sikka, S. C., Kadowitz, P. J., Hellstrom, W. J. (1994) Nitric oxide mediates penile erection in cats *J.Urol.* **151**, 234-237
 48. Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, A. (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of the cell function and communication
Biochem.Pharmacol. **38**, 1709-1715
 49. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J. R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandins endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation *Nature* **236**, 663-665
 50. Moncada, S., Herman, A. G., Higgs, E. A., Vane, J. R. (1977) Differential formation of prostacyclin PGX or PGI₂ by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium *Thromb.Res.* **11**, 323-344
 51. Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., Samuelsson, B. (1974) Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that caused platelet aggregation
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **71**, 345-349
 52. Parkington, H. C., Coleman, H. A., Tare, M. (2004) Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization *Pharmacol Res* **49**, 509-514
 53. Kukovetz, WR., Holzmann, S., Wurm, A. (1979) Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries *J Cyclic Nucleotide Res* **5**, 469-476
 54. Ignarro, L. J., Harbison, R., Wood, K. S. (1985) Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanisms of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate *J Pharmacol Exp Ther* **233**, 560-569
 55. Siegel, G., Stock, G., Schnalke, F. (1987) Electrical and mechanical effects of prostacyclin in canine carotide artery. In Gryglewski, R. J. and Stock, G., editors. *Prostacyclin and its stable analogue iloprost.*, Berlin / Keidelberg
 56. Parkington, H. C., Tare, M., Tonta, M. A., Coleman, H. A. (1993) Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine *J Physiol* **465**, 459-476
 57. Parkington, H. C., Tonta, M. A., Coleman, H. A., Tare, M. (1995) Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle *J Physiol* **484 (Pt 2)**, 469-480

58. Schubert, R., Serebryakov, V. N., Mewes, H., Hopp, H. H. (1997) Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase *Am.J Physiol* **272**, H1147-H1156
59. Clapp, L. H., Turcato, S., Hall, S., Baloch, M. (1998) Evidence that Ca²⁺-activated K⁺ channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost *Eur.J Pharmacol* **356**, 215-224
60. Yajima, K., Nishiyama, M., Yamamoto, Y., Suzuki, H. (1999) Inhibition of endothelium-dependent hyperpolarization by endothelial prostanoids in guinea-pig coronary artery *Br.J Pharmacol* **126**, 1-10
61. Thapaliya, S., Matsuyama, H., Takewaki, T. (2000) Bradykinin causes endothelium-independent hyperpolarisation and neuromodulation by prostanoid synthesis in hamster mesenteric artery *Eur.J Pharmacol* **408**, 313-321
62. Bolton, T. B., Lang, R. S., Takewaki, T. (1984) Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery *J.Physiol.* **351**, 549-572
63. Komori, K. Suzuki, H. (1987) Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery *Circ.Res* **61**, 586-593
64. Chen, G., Suzuki, H., Weston, A. H. (1988) Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels *Br J Pharmacol* **95**, 1165-1174
65. Urakami-Harasawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A. (1997) Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries *J Clin Invest* **100**, 2793-2799
66. Miura, H., Liu, Y., Gutterman, D. D. (1999) Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and Ca²⁺-activated K⁺ channels *Circulation* **99**, 3132-3138
67. Katz, S. D. Krum, H. (2001) Acetylcholine-mediated vasodilation in the forearm circulation of patients with heart failure: indirect evidence for the role of endothelium-derived hyperpolarizing factor *Am.J Cardiol.* **87**, 1089-1092
68. Coats, P., Johnston, F., MacDonald, J., McMurray, J. J., Hillier, C. (2001) Endothelium-derived hyperpolarizing factor : identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries *Circulation* **103**, 1702-1708
69. Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., Weston, A. H. (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries *Nature* **396**, 269-272
70. Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., Harder, D. R. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors *Circ.Res* **78**, 415-423

71. Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., Busse, R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries *Nature* **401**, 493-497
72. Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., Takeshita, A. (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice *J Clin Invest* **106**, 1521-1530
73. Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Takeshita, A. (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries *Biochem.Biophys.Res Commun.* **290**, 909-913
74. Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Goto, M., Ogasawara, Y., Kajiya, F. (2003) Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo *Circulation* **107**, 1040-1045
75. Randall, M. D., Alexander, S. P., Bennett, T., Boyd, E. A., Fry, J. R., Gardiner, S. M., Kemp, P. A., McCulloch, A. I., Kendall, D. A. (1996) An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant *Biochem.Biophys.Res Commun.* **229**, 114-120
76. Chauhan, S. D., Nilsson, H., Ahluwalia, A., Hobbs, A. J. (2003) Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 1426-1431
77. Campbell, W. B. Harder, D. R. (2001) Prologue: EDHF--what is it? *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, H2413-H2416
78. Archer, S. L., Gragasin, F. S., Wu, X., Wang, S., McMurtry, S., Kim, D. H., Platonov, M., Koshal, A., Hashimoto, K., Campbell, W. B., Falck, J. R., Michelakis, E. D. (2003) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels *Circulation* **107**, 769-776
79. Doughty, J. M., Plane, F., Langton, P. D. (1999) Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium *Am.J Physiol* **276**, H1107-H1112
80. Scotland, R. S., Chauhan, S., Vallance, P. J., Ahluwalia, A. (2001) An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide *Hypertension* **38**, 833-839
81. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells *Nature* **332**, 411-415
82. Berrazueta, J. R., Bhagat, K., Vallance, P., MacAllister, R. J. (1997) Dose- and time-dependency of the dilator effects of the endothelin antagonist, BQ-123, in the human forearm *Br J Clin Pharmacol* **44**, 569-571

83. Luscher, T. F., Boulanger, C. M., Dohi, Y., Yang, Z. H. (1992) Endothelium-derived contracting factors *Hypertension* **19**, 117-130
84. Shupnik, M. A., Ridgway, E. C., Chin, W. W. (1989) Molecular biology of thyrotropin *Endocr.Rev.* **10**, 459-475
85. Yen, P. M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action *Physiol Rev.* **81**, 1097-1142
86. Dunn, J. T. Dunn, A. D. (1999) The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis *Biochimie* **81**, 505-509
87. Braverman, L. E., Ingbar, S. H., Sterling, K. (1970) Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine (T₃) in athyreotic human subjects *J.Clin.Invest* **49**, 855-864
88. Koehle, J. (2000) The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability *Rev.Endocr.Metab Disord.* **1**, 49-58
89. Mendel, C. M., Weisiger, R. A., Jones, A. L., Cavalieri, R. R. (1987) Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study *Endocrinology* **120**, 1742-1749
90. Bianco, AC., Salvatore, D., Gereben, B. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of iodothyronine selenodeiodinases *Endocr.Rev.* **23**, 38-89
91. Leonard, JL. Visser, T. (1986) Biochemistry of deiodination. In Henneman, G., editor. *Thyroid hormone metabolism*, New York
92. St Germain, D. L. Galton, V. A. (1997) The deiodinase family of selenoproteins *Thyroid* **7**, 655-668
93. Mizuma, H., Murakami, M., Mori, M. (2001) Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase *Circ.Res* **88**, 313-318
94. Yasuzawa-Amano, S., Toyoda, N., Maeda, A., Kosaki, A., Mori, Y., Iwasaka, T., Nishikawa, M. (2004) Expression and regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in rat aorta media *Endocrinology* **145**, 5638-5645
95. Larsen, P. R. (1996) Thyroid hormone transport, cellular uptake, metabolism and molecular action. In DeGroot, LJ. and Larsen, PR., editors. *The Thyroid and its Disease*, Churchill Livingstone, New York
96. Leonard, JL. Koehle, J. (1996) Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In Braverman, L. E. and Utiger, R. D., editors. *Werner and Ingbar's The Thyroid: A fundamental and Clinical Text*, Lippincott-Raven, Philadelphia
97. Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Mariash, C. N., Kinlaw, W. B., Wong, N. C., Freake, H. C. (1987) Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level *Endocr.Rev.* **8**, 288-308

98. Samuels, H. H., Forman, B. M., Horowitz, Z. D., Ye, Z. S. (1988) Regulation of gene expression by thyroid hormone *J.Clin.Invest* **81**, 957-967
99. Lazar, M. A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities *Endocr.Rev.* **14**, 184-193
100. Koenig, R. J., Lazar, M. A., Hodin, R. A., Brent, G. A., Larsen, P. R., Chin, W. W., Moore, D. D. (1989) Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing *Nature* **337**, 659-661
101. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Chin, W. W. (1989) Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 7771-7774
102. Salter, D. R., Dyke, C. M., Wechsler, A. S. (1992) Triiodothyronine (T₃) and cardiovascular therapeutics: a review *J Card Surg.* **7**, 363-374
103. Rudinger, A., Mylotte, K. M., Davis, P. J., Davis, F. B., Blas, S. D. (1984) Rabbit myocardial membrane Ca²⁺-adenosine triphosphatase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone *Arch Biochem.Biophys.* **229**, 379-385
104. Klein, I., Levey, G. S., Epstein, SE. (1971) Effects of reserpine on the increase in myocardial adenyl cyclase activity produced by thyroid hormone *Proc Soc Exp Biol Med* **137**, 366-369
105. Lawrence, W. D., Schoenl, M., Davis, P. J. (1989) Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity. A novel action of thyroid hormone *J Biol.Chem* **264**, 4766-4768
106. Harris, D. R., Green, W. L., Craelius, W. (1991) Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes *Biochim.Biophys.Acta* **1095**, 175-181
107. Dudley, S. C., Jr. Baumgarten, C. M. (1993) Bursting of cardiac sodium channels after acute exposure to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine *Circ.Res* **73**, 301-313
108. Davis, P. J. Davis, F. B. (1993) Acute cellular actions of thyroid hormone and myocardial function *Ann.Thorac.Surg.* **56**, S16-S23
109. Graves, R. (1835) Newly observed affectation of the thyroid gland in females *Lond.Med.Surg.J* **7**, 517
110. Klein, I. (1990) Thyroid hormone and the cardiovascular system *Am.J Med* **88**, 631-637
111. Levey, G. S. Klein, I. (1990) Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism *Am.J Med* **88**, 642-646
112. Polikar, R., Burger, A. G., Scherrer, U., Nicod, P. (1993) The thyroid and the heart *Circulation* **87**, 1435-1441

113. Gick, G. G., Melikian, J., Ismail-Beigi, F. (1990) Thyroidal enhancement of rat myocardial Na,K-ATPase: preferential expression of alpha 2 activity and mRNA abundance *J Membr.Biol.* **115**, 273-282
114. Ojamaa, K., Sabet, A., Kenessey, A., Shenoy, R., Klein, I. (1999) Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific *Endocrinology* **140**, 3170-3176
115. Ishikawa, T., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mamiya, S., Hidaka, H. (1989) Thyroid hormones directly interact with vascular smooth muscle strips *Mol.Pharmacol* **35**, 760-765
116. Ojamaa, K., Klemperer, J. D., Klein, I. (1996) Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle *Thyroid* **6**, 505-512
117. Park, K. W., Dai, H. B., Ojamaa, K., Lowenstein, E., Klein, I., Sellke, F. W. (1997) The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries *Anesth.Analg.* **85**, 734-738
118. Colantuoni, A., Marchiafava, P. L., Lapi, D., Forini, F. S., Iervasi, G. (2005) Effects of tetraiodothyronine and triiodothyronine on hamster cheek pouch microcirculation *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **288**, H1931-H1936
119. Scivoletto, R., Fortes, Z. B., Garcia-Leme, J. (1986) Thyroid hormones and vascular reactivity: role of the endothelial cell *Eur.J Pharmacol* **129**, 271-278
120. Gunasekera, R. D. Kuriyama, H. (1990) The influence of thyroid states upon responses of the rat aorta to catecholamines *Br.J Pharmacol* **99**, 541-547
121. McAllister, R. M., Grossenburg, V. D., Delp, M. D., Laughlin, M. H. (1998) Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses *Am.J Physiol* **274**, E946-E953
122. Ortega, J., Vila, J. M., Mauricio, M. D., Segarra, G., Medina, P., Martinez-Leon, J. B., Lluch, S. (2005) Nitric oxide mediates abnormal responsiveness of thyroid arteries in methimazole-treated patients *Eur.J Endocrinol.* **152**, 551-556
123. Napoli, R., Biondi, B., Guardasole, V., Matarazzo, M., Pardo, F., Angelini, V., Fazio, S., Sacca, L. (2001) Impact of hyperthyroidism and its correction on vascular reactivity in humans *Circulation* **104**, 3076-3080
124. Quesada, A., Sainz, J., Wangenstein, R., Rodriguez-Gomez, I., Vargas, F., Osuna, A. (2002) Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats *Eur.J Endocrinol.* **147**, 117-122
125. McAllister, R. M., Albarracin, I., Price, E. M., Smith, T. K., Turk, J. R., Wyatt, K. D. (2005) Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels *J Endocrinol.* **185**, 111-119
126. Bussemaker, E., Popp, R., Fisslthaler, B., Larson, C. M., Fleming, I., Busse, R., Brandes, R. P. (2003) Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery *Cardiovasc Res* **59**, 181-188

127. Bussemaker, E., Popp, R., Fisslthaler, B., Larson, C. M., Fleming, I., Busse, R., Brandes, R. P. (2003) Aged spontaneously hypertensive rats exhibit a selective loss of EDHF-mediated relaxation in the renal artery *Hypertension* **42**, 562-568
128. Ozdemirci, S., Yildiz, F., Utkan, T., Ulak, G., Cetinaslan, B., Erden, F., Gacar, N. (2001) Impaired neurogenic and endothelium-dependent relaxant responses of corpus cavernosum smooth muscle from hyperthyroid rabbits *Eur.J Pharmacol* **428**, 105-111
129. Hermenegildo, C., Medina, P., Peiro, M., Segarra, G., Vila, J. M., Ortega, J., Lluch, S. (2002) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients *J Clin Endocrinol.Metab* **87**, 5636-5640
130. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure *Lancet* **339**, 572-575
131. Segarra, G., Medina, P., Ballester, R. M., Lluch, P., Aldasoro, M., Vila, J. M., Lluch, S., Pelligrino, D. A. (1999) Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries *Stroke* **30**, 2206-2210
132. Segarra, G., Medina, P., Vila, J. M., Martínez-León, J. B., Ballester, R. M., Lluch, P., Lluch, S. (2000) Contractile effects of arginine analogues on human internal thoracic and radial arteries *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **120**, 729-736
133. Segarra, G., Medina, P., Vila, J. M., Chuan, P., Domenech, C., Torondel, B., Lluch, S. (2001) Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries *Am.J.Hypertens.* **14**, 1142-1148
134. He, G. W., Rosenfeldt, F. L., Buxton, B. F., Angus, J. A. (1989) Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm *Circulation* **80**, 1141-1150
135. He, G. W., Angus, J. A., Rosenfeldt, F. L. (1988) Reactivity of the canine isolated internal mammary artery, saphenous vein, and coronary artery to constrictor and dilator substances: relevance to coronary bypass graft surgery *J Cardiovasc Pharmacol* **12**, 12-22
136. Caplan, B. A. Schwartz, C. J. (1973) Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta *Atherosclerosis* **6**, 713-719
137. Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., Mayer, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one *Mol.Pharmacol.* **48**, 184-188
138. Walters, M. N. Willoughby, D. A. (1965) Indomethacin, a new anti-inflammatory drug: its potential use as a laboratory tool *J Pathol.Bacteriol.* **90**, 641-648
139. Shen, T. Y. Winter, C. A. (1977) Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs *Adv Drug Res* **12**, 90-245

140. Garcia, M. L., Knaus, H. G., Munujos, P., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J. (1995) Charybdotoxin and its effects on potassium channels *Am.J.Physiol.* **269**, C1-C10
141. Murphy, M. E. Brayden, J. E. (1995) Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries *J.Physiol.* **489**, 723-734
142. Nelissen-Vrancken, H. J., Wang, J. F., Struijker Boudier, H. A., Schoemaker, R. G., Smits, J. F. (1997) Ouabain improves cardiac function in vivo in rats with heart failure after chronic but not acute treatment *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**, 203-209
143. Armstrong, C. M., Swenson, R. P., Jr., Taylor, S. R. (1982) Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions *J Gen.Physiol* **80**, 663-682
144. Fearon, I. M., Palmer, A. C., Balmforth, A. J., Ball, S. G., Mikala, G., Peers, C. (1998) Inhibition of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel alpha1C subunits by 3-isobutyl-1-methylxanthine *Eur.J Pharmacol* **342**, 353-358
145. Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine *J Cyclic.Nucleotide.Res.* **3**, 23-35
146. Andreopoulos, S. Papapetropoulos, A. (2000) Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation *Gen.Pharmacol* **34**, 147-157
147. Papapetropoulos, A., Marczin, N., Mora, G., Milici, A., Murad, F., Catravas, J. D. (1995) Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents *Hypertension* **26**, 696-704
148. Awad, J. A., Johnson, R. A., Jakobs, K. H., Schultz, G. (1983) Interactions of forskolin and adenylyl cyclase. Effects on substrate kinetics and protection against inactivation by heat and N-ethylmaleimide *J Biol Chem* **258**, 2960-2965
149. Laurenza, A., Sutkowski, E. M., Seamon, K. B. (1989) Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol Sci.* **10**, 442-447
150. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with phenol reagent *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275
151. Fleming, W. W., Westfall, D. P., De, I. L., I, Jellett, L. B. (1972) Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues *J Pharmacol Exp.Ther.* **181**, 339-345
152. Danzi, S. Klein, I. (2002) Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease *Thyroid* **12**, 467-472
153. Theilen, E. O. Wilson, W. R. (1967) Hemodynamic effects of peripheral vasoconstriction in normal and thyrotoxic subjects *J Appl.Physiol* **22**, 207-210

154. Goldman, S., Olajos, M., Morkin, E. (1984) Control of cardiac output in thyrotoxic calves. Evaluation of changes in the systemic circulation *J Clin Invest* **73**, 358-365
155. Biondi, B., Palmieri, E. A., Lombardi, G., Fazio, S. (2002) Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism *J Clin Endocrinol.Metab* **87**, 968-974
156. Graettinger, J. S., Muenster, J. J., Selverstone, L. A., Campbell, J. A. (1959) A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hyperthyroidism with and without congestive heart failure *J Clin Invest* **38**, 1316-1327
157. Streeten, D. H., Anderson, G. H., Jr., Howland, T., Chiang, R., Smulyan, H. (1988) Effects of thyroid function on blood pressure. Recognition of hypothyroid hypertension *Hypertension* **11**, 78-83
158. Bing, R. F., Briggs, R. S., Burden, A. C., Russell, G. I., Swales, J. D., Thurston, H. (1980) Reversible hypertension and hypothyroidism *Clin Endocrinol.(Oxf)* **13**, 339-342
159. Resnick, L. M. Laragh, J. H. (1982) PLasma renin activity in syndromes of thyroid hormone excess and deficiency *Life Sci.* **30**, 585-586
160. Maeda, A., Toyoda, N., Yasuzawa-Amano, S., Iwasaka, T., Nishikawa, M. (2003) Type 2 deiodinase expression is stimulated by growth factors in human vascular smooth muscle cells *Mol.Cell Endocrinol.* **200**, 111-117
161. Croteau, W., Davey, J. C., Galton, V. A., St Germain, D. L. (1996) Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues *J Clin Invest* **98**, 405-417
162. Burmeister, L. A., Pachucki, J., St Germain, D. L. (1997) Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms *Endocrinology* **138**, 5231-5237
163. Kim, S. W., Harney, J. W., Larsen, P. R. (1998) Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction *Endocrinology* **139**, 4895-4905
164. Leonard, J. L., Silva, J. E., Kaplan, M. M., Mellen, S. A., Visser, T. J., Larsen, P. R. (1984) Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone *Endocrinology* **114**, 998-1004
165. Aldasoro, M., Medina, P., Vila, J. M., Otero, E., Martínez-León, J. B., Lluch, S. (1997) Endothelium-dependent relaxation of human saphenous veins in response to vasopressin and desmopressin *J.Vasc.Surg.* **25**, 696-703
166. Chaikhouni, A., Crawford, F. A., Kochel, P. J., Olanoff, L. S., Halushka, P. V. (1986) Human internal mammary artery produces more prostacyclin than saphenous vein *J Thorac.Cardiovasc.Surg.* **92**, 88-91

167. Pearson, P. J., Evora, P. R., Schaff, H. V. (1992) Bioassay of EDRF from internal mammary arteries: implications for early and late bypass graft patency *Ann.Thorac.Surg.* **54**, 1078-1084
168. Luscher, T. F., Diederich, D., Siebenmann, R., Lehmann, K., Stulz, P., von Segesser, L., Yang, Z. H., Turina, M., Gradel, E., Weber, E. , . (1988) Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts *N.Engl.J Med* **319**, 462-467
169. Chua, Y. L., Pearson, P. J., Evora, P. R., Schaff, H. V. (1993) Detection of intraluminal release of endothelium-derived relaxing factor from human saphenous veins *Circulation* **88**, II128-II132
170. Liu, Z. G., Ge, Z. D., He, G. W. (2000) Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein *Circulation* **102**, III296-III301
171. Noguchi, T., Kazama, Y., Kanemaru, Y., Onaya, T. (1985) The effects of thyroxine and methimazole treatment on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) in the rat *Prostaglandins* **30**, 553-561
172. Edwards, G., Feletou, M., Gardener, M. J., Thollon, C., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H. (1999) Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries *Br.J Pharmacol* **128**, 1788-1794
173. Milesi, V., Aiello, E. A., Rebolledo, A., Gomez, A. A., Grassi de Gende, A. O. (1999) Role of a Ca²⁺-activated K⁺ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells *Pflugers Arch* **437**, 455-461
174. Taylor, S. G. Weston, A. H. (1988) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium *Trends Pharmacol.Sci.* **9**, 272-274
175. Feletou, M. Vanhoutte, P. M. (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle *Br.J Pharmacol* **93**, 515-524
176. Garland, C. J., Plane, F., Kemp, B. K., Cocks, T. M. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone *Trends Pharmacol.Sci.* **16**, 23-30
177. Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, Th., Weston, A. H. (1994) Ion channel modulation by NS 1619, the putative BK_{Ca} channel opener, in vascular smooth muscle *Br.J.Pharmacol.* **113**, 1538-1547
178. Martinez-Leon, J. B., Segarra, G., Medina, P., Vila, J. M., Lluch, P., Peiro, M., Otero, E., Lluch, S. (2003) Ca²⁺-activated K⁺ channels mediate relaxation of forearm veins in chronic renal failure *J Hypertens.* **21**, 1927-1934
179. Torondel, B., Vila, J. M., Segarra, G., Lluch, P., Medina, P., Martinez-Leon, J., Ortega, J., Lluch, S. (2004) Endothelium-dependent responses in human isolated thyroid arteries from donors *J Endocrinol* **181**, 379-384

180. Lei, J., Mariash, C. N., Ingbar, D. H. (2004) 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent *J Biol Chem* **279**, 47589-47600
181. Lei, J., Nowbar, S., Mariash, C. N., Ingbar, D. H. (2003) Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **285**, L762-L772
182. Blaustein, M. P. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness *Am J Physiol* **264**, 1367-1387
183. Sakaguchi, Y., Cui, G., Sen, L. (1996) Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes *Endocrinology* **137**, 4744-4751
184. Ignarro, L. J., Lippton, H. L., Edwards, J. C., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J., Gruetter, C. A. (1981) Mechanisms of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **218**, 739-749
185. Murad, F. (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation *J.Clin.Invest.* **78**, 1-5
186. Pagani, E. D., Buchholz, R. A., Silver, P. J. (1992) Cardiovascular cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in regulating cardiovascular function *Basic Res Cardiol* **87 Suppl 1**, 73-86
187. Beavo, J. A. (1988) Multiple isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **22**, 1-38
188. Pliam, N. B. Goldfine, I. D. (1977) High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **79**, 166-172
189. Segal, J. (1989) A rapid, extranuclear effect of 3,5,3'-triiodothyronine on sugar uptake by several tissues in the rat in vivo. Evidence for a physiological role for the thyroid hormone action at the level of the plasma membrane *Endocrinology* **124**, 2755-2764
190. Cheng, S. Y., Maxfield, F. R., Robbins, J., Willingham, M. C., Pastan, I. H. (1980) Receptor-mediated uptake of 3,3',5-triiodo-L-thyronine by cultured fibroblasts *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**, 3425-3429
191. Yamauchi, K. Tata, J. R. (1994) Purification and characterization of a cytosolic thyroid-hormone-binding protein (CTBP) in *Xenopus* liver *Eur.J Biochem.* **225**, 1105-1112
192. Lennon, A. M. (1992) Purification and characterization of rat brain cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein. Evidence for binding activity dependent on NADPH, NADP and thioredoxin *Eur.J Biochem.* **210**, 79-85

193. Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine *J.Cyclic Nucleotide Res.* **3**, 23-35
194. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., Murad, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**, 3203-3207
195. Lincoln, T. M. Cornwell, T. L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins *FASEB J.* **7**, 328-338
196. Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P., Giulumian, A. D., White, R. E. (1997) Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels *Am.J Physiol* **273**, H76-H84
197. Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Cornwell, T. L. (1994) Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase *Hypertension* **23**, 1141-1147
198. Beavo, J. A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms *Physiol.Rev.* **75**, 725-748
199. Goldberg, N. D., Haddock, M. K., Nicol, S. E., Glass, D. B., Sanford, C. H., Kuehl, F. A., Jr., Estensen, R. (1975) Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis *Adv.Cyclic.Nucleotide.Res.* **5**, 307-330
200. Francis, S. H., Noblett, B. D., Todd, B. W., Wells, J. N., Corbin, J. D. (1988) Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase *Mol.Pharmacol* **34**, 506-517
201. Gao, Y., Dhanakoti, S., Tolsa, J. F., Raj, J. U. (1999) Role of protein kinase G in nitric oxide- and cGMP-induced relaxation of newborn ovine pulmonary veins *J Appl.Physiol* **87**, 993-998
202. Haynes, J., Jr., Kithas, P. A., Taylor, A. E., Strada, S. J. (1991) Selective inhibition of cGMP-inhibitable cAMP phosphodiesterase decreases pulmonary vasoreactivity *Am.J Physiol* **261**, H487-H492
203. Lincoln, T. M., Cornwell, T. L., Taylor, A. E. (1990) cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells *Am J Physiol* **258**, C399-C407
204. Toyoshima, H., Nasa, Y., Hashizume, Y., Koseki, Y., Isayama, Y., Kohsaka, Y., Yamada, T., Takeo, S. (1998) Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle *J Cardiovasc.Pharmacol* **32**, 543-551

-
205. White, R. E., Darkow, D. J., Lang, J. L. (1995) Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism *Circ.Res.* **77**, 936-942
 206. Cornwell, T. L., Arnold, E., Boerth, N. J., Lincoln, T. M. (1994) Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP *Am.J Physiol* **267**, C1405-C1413
 207. Haynes, J., Jr., Robinson, J., Saunders, L., Taylor, A. E., Strada, S. J. (1992) Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation *Am.J Physiol* **262**, H511-H516
 208. Sakai, A. Voelkel, N. F. (1988) Dibutyl cyclic adenosine monophosphate inhibits pulmonary vasoconstriction *Lung* **166**, 221-231
 209. Conti, M. A. Adelstein, R. S. (1981) The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase *J Biol.Chem* **256**, 3178-3181
 210. Hei, Y. J., MacDonell, K. L., McNeill, J. H., Diamond, J. (1991) Lack of correlation between activation of cyclic AMP-dependent protein kinase and inhibition of contraction of rat vas deferens by cyclic AMP analogs *Mol.Pharmacol* **39**, 233-238
 211. Brent, G. A. (1994) The molecular basis of thyroid hormone action *N.Engl.J Med* **331**, 847-853
 212. Jones, T. H. (1994) Interleukin-6 an endocrine cytokine *Clin Endocrinol.(Oxf)* **40**, 703-713
 213. Klemperer, J. D., Ojamaa, K., Klein, I. (1996) Thyroid hormone therapy in cardiovascular disease *Prog.Cardiovasc.Dis.* **38**, 329-336