



Facultat de Medicina i Odontologia

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADRENÉRGICA DE LA VENA SAFENA HUMANA

TESIS DOCTORAL

040-F Cirugía y sus especialidades

Presentada por:

Marina Juez López

Licenciada en Medicina

Dirigida por:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dra. Eva Serna García

Dr. Juan Martínez-León

Valencia 2014

Dña. **María Dolores Mauricio Aviñó**, Profesora Contratada Doctora por la Universidad de Valencia, Dña. **Eva Serna García**, Doctora por la Universidad de Valencia y Responsable del Servicio de Análisis Multigénico (UCIM) de la Universidad de Valencia y D. **Juan Martínez-León**, Catedrático de Cirugía de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: que **Marina Juez López** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado, “**Estudio de la respuesta adrenérgica de la vena safena humana**” para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 25 de Febrero de 2014.

Fdo:

Dra. M. Dolores Mauricio

Fdo:

Dra. Eva Serna

Fdo:

Dr. Juan Martínez-León

La realización de esta tesis no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, que de una forma u otra, participaron en su elaboración directa o indirectamente, con su actitud positiva y cooperante. Por todo ello, quisiera aprovechar este momento para darles las gracias:

Al Dr. Otero y Dr. Carbonell por enseñarme todo lo que he aprendido de cirugía cardiovascular.

A las enfermeras del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico, especialmente a Concha y Mónica, por su predisposición y buena voluntad en la recogida de muestras.

A la Dra. Eva Serna y Dra. M. Dolores Mauricio, directoras de esta tesis, por prestarme vuestra ayuda incondicional y responder a mis dudas. Sin vosotras no habría sido posible este estudio.

Al Departamento de Fisiología, sobre todo al Dr. José María Vila y Dr. Martín Aldasoro por contagiarme su entusiasmo por las ciencias básicas.

Al Dr. Martínez León, mi mentor y director de esta tesis, por enseñarme cómo debe ser un cirujano, en lo profesional y sobre todo en lo humano. Gracias por tu apoyo incondicional.

A mi familia, en especial a mis padres, por cuidar de mí, por apoyarme en mis decisiones y hacer posible que hoy esté aquí.
A Pplu y a mi hija por soportarme todos los días y hacerme feliz.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN	13
Cardiopatía isquémica y cirugía coronaria	15
Uso de fármacos inotrópicos y vasoconstrictores	20
Vena safena interna	23
Función de la pared vascular	25
Papel de las prostaglandinas en la reactividad vascular	26
Papel del óxido nítrico.....	27
Papel del factor hiperpolarizante derivado del endotelio	33
Canales de potasio. Tipos de canales de potasio	35

Índice

Canales de calcio. Clasificación de los canales de calcio.....	43
Canales de calcio tipo T	45
Canales de calcio tipo L	46
Canales de calcio tipo N.....	47
Canales de calcio tipo P.....	47
Canales de calcio tipo Q.....	48
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	53
Objetivo general	55
Objetivos específicos.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
Procedencia de los segmentos venosos	59

Procedimiento experimental	60
1. Preparación de las muestras	60
2. Tensión pasiva óptima	63
3. Curvas concentración - respuesta.....	65
4. Curvas frecuencia-respuesta	67
5. Fármacos y soluciones	72
 Análisis de datos.....	 73
 RESULTADOS	 75
 Respuesta al cloruro potásico	 77
 Respuesta a la noradrenalina	 78
1. Participación de prostaglandinas.....	78
2. Participación de óxido nítrico	79
3. Participación de canales de K ⁺ activados por calcio.....	82
4. Participación de canales de K ⁺ sensibles a ATP	86
5. Participación de canales de K ⁺ voltaje dependientes	88

6. Papel de los canales de calcio	91
Respuesta al estímulo eléctrico.....	93
1. Participación de prostaglandinas.....	95
2. Participación de óxido nítrico	95
3. Participación de canales de K^+ activados por calcio	99
4. Participación de canales de K^+ sensibles a ATP	102
5. Participación de canales de K^+ voltaje dependientes	102
6. Papel de los canales de calcio	106
DISCUSIÓN	115
Procedencia de los segmentos venosos	120
Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental.....	122
Respuesta a la noradrenalina y al estímulo eléctrico	124
1. Papel de las prostaglandinas	126
2. Papel del óxido nítrico	127

Índice

3. Participación de canales de K ⁺ activados por calcio (K _{ca})	130
4. Participación de canales de K ⁺ sensibles a ATP	135
5. Participación de canales de K ⁺ voltaje dependientes.....	138
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147

ABREVIATURAS

Abreviaturas

4-AP	4- aminopiridina
Ca ⁺²	Ion Calcio
DHP	Dihidropiridinas
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
GC	Guanilato ciclasa
GMPc	Guanosín 3',5' cíclico monofosfato
GTP	Guanosín-5-trifosfato
HTA	Hipertensión arterial
K ⁺	Ion potasio
K _{ATP}	Canales de K ⁺ sensibles al ATP
K _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por calcio
K _{IR}	Canales rectificadores de K ⁺
K _V	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
L-NMMA	L-arginina, N ^G -monometil-L-arginina
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
SBGC	Síndrome de bajo gasto cardíaco

Abreviaturas

TX A ₂	Tromboxano A ₂
VGCC	Canales de calcio activados por voltaje
VSI	Vena safena interna

INTRODUCCIÓN

CARDIOPATIA ISQUÉMICA Y CIRUGÍA CORONARIA

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en el mundo en los inicios del tercer milenio (OMS, 2003). En los países desarrollados lo han sido durante el siglo XX, suponiendo cerca del 50% de la mortalidad total.

La enfermedad isquémica del corazón ocasiona en nuestro país el mayor número de muertes por enfermedad cardiovascular. Aunque la incidencia de los infartos agudos de miocardio en la población de 25 a 74 años se mantiene estable, se estima que cada año aumentará un 1,5% el número de casos de infarto y angina debido al envejecimiento de la población.

Es una entidad que tiene un enorme impacto en el individuo que la padece, en su calidad de vida y en su futuro personal y social.

El tratamiento integral de los pacientes con cardiopatía isquémica incluye, en la actualidad, medidas farmacológicas, intervenciones para mejorar el flujo coronario y actividades preventivas que van desde los cambios de hábitos de vida a modernas y potentes terapias farmacológicas que actúan sobre las concentraciones de colesterol o la agregación plaquetaria.

Se han realizado múltiples estudios que describen y comparan la eficacia y la efectividad del tratamiento quirúrgico en diversas situaciones clínicas y anatómicas, y en relación con el tratamiento médico o la angioplastia coronaria. La cirugía coronaria sigue representando la estrategia de revascularización más consolidada que, sin duda alguna, ha superado con creces la prueba del tiempo. Los resultados de los estudios aleatorizados clásicos que comparaban el tratamiento médico con la cirugía demostraron no sólo su utilidad en el tratamiento sintomático de los pacientes con cardiopatía isquémica, sino también su capacidad

para mejorar el pronóstico de importantes subgrupos de pacientes con enfermedad coronaria.

El mérito de realizar el primer bypass coronario ha sido atribuido a varios cirujanos. En 1962 Sabiston comunicó el primer bypass aortocoronario, pero su paciente falleció en el período postoperatorio precoz de un accidente cerebrovascular. Según algunos autores fueron Garret y DeBakey los que realizaron la primera revascularización coronaria con éxito en 1964 con un injerto de vena safena interna (VSI) aunque no se publicó hasta 1973. En 1964 en Leningrado, Kolesov ¹⁻³ realizó la anastomosis entre la arteria mamaria interna izquierda y la arteria descendente anterior. Poco después, Green ⁴, en 1968, publica la primera serie de pacientes. Desde finales de los años sesenta se popularizó la revascularización coronaria con injertos venosos y de arteria mamaria interna hasta convertirse en una de las intervenciones mayores más comunes en nuestros días.

La derivación aortocoronaria clásica consiste en la conexión de la aorta con segmentos de las arterias coronarias distalmente a las lesiones estenosantes u obstructivas mediante un conducto vascular. Los conductos vasculares son generalmente extraídos del propio enfermo y pueden ser venosos o arteriales. Los segmentos venosos, dispuestos en sentido invertido debido a la presencia de válvulas, son anastomosados sobre la aorta ascendente y sobre la arteria coronaria. El conducto venoso más utilizado es la safena interna y si no está disponible la safena externa y la vena cefálica. La principal limitación de los conductos venosos es la disminución progresiva de su permeabilidad a lo largo del tiempo. El conducto arterial más utilizado es la arteria mamaria interna pediculada, conservando su origen en la subclavia. La elección del conducto para la realización del injerto se basa en la edad del paciente, su historia clínica, los vasos a revascularizar y la preferencia del cirujano. Se ha demostrado que la utilización de un injerto de arteria mamaria interna izquierda pediculado mejora

significativamente la supervivencia a corto y largo plazo, por lo que debería ser utilizado cuando sea posible ⁵.

Desafortunadamente, los espasmos son frecuentes durante la manipulación tanto de la vena safena como la arteria mamaria y se han descrito también en el período postoperatorio ⁶. La naturaleza de los vasoespasmos ⁷ no se ha dilucidado todavía pero durante y tras la revascularización coronaria aumentan los niveles circulantes de varios agentes potencialmente espasmogénicos ^{7, 8}. Existe un incremento de la activación del sistema nervioso simpático que produce un incremento de los niveles plasmáticos de catecolaminas. La liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares durante la manipulación de los injertos provoca también contracción ⁹. Estudios histológicos han identificado fibras nerviosas simpáticas en la adventicia de VSI y arteria mamaria interna ^{10, 11}. Previamente se había demostrado que la estimulación eléctrica de la VSI y de la arteria mamaria

interna estaba mediada fundamentalmente por la liberación de NA por las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares^{12, 13, 14}.

USO DE FARMACOS INOTRÓPICOS Y VASOCONSTRICTORES

A pesar de la mejoría en las técnicas quirúrgicas y en la protección miocárdica, con frecuencia los pacientes presentan un síndrome de bajo gasto cardíaco de mayor o menor grado durante el periodo perioperatorio. Como esta cirugía se realiza en una población cada vez de más edad y con una importante morbilidad asociada, el riesgo de desarrollar un síndrome de bajo gasto cardíaco está cada vez más presente.

Esta situación puede llevar a un aporte reducido de oxígeno a los tejidos y la aparición de un fracaso multiorgánico, responsable del incremento de la morbi-mortalidad, de la

prolongación de la estancia hospitalaria después de la cirugía cardíaca y del gasto sanitario ¹⁵.

El tratamiento del síndrome de bajo gasto cardíaco perioperatorio una vez descartados y/o corregidos otros factores (anemia, hipovolemia, hipoxia, alteraciones metabólicas, arritmias...) incluye la administración de fármacos inotrópicos (adrenalina, dobutamina) con efecto vasodilatador (levosimendán) o vasoconstrictor (noradrenalina, efedrina) y el empleo del balón de contrapulsación intraaórtico o la asistencia ventricular ¹⁶.

Los agentes inotrópicos y vasopresores se han convertido en un pilar terapéutico básico para el manejo de múltiples síndromes cardiovasculares. En términos amplios, estas sustancias tienen acciones excitatorias e inhibitorias sobre el corazón y el tejido vascular, así como efectos sobre el sistema nervioso central y sistema nervioso autónomo y a nivel metabólico.

En el estudio de Bastien y col.¹⁷, realizado en Francia sobre el uso de fármacos inotrópicos en el postoperatorio de cirugía cardíaca, el 38% de los pacientes requirió uno o más fármacos inotrópicos. Más del 70% de los pacientes con una fracción de eyección del ventrículo izquierdo menor de 45%, requieren aporte inotrópico después de la cirugía¹⁸.

La eficacia clínica de estos fármacos inotrópicos y vasoconstrictores se ha investigado ampliamente mediante el examen de su impacto sobre variables hemodinámicas, y la práctica clínica está basada en opiniones de expertos, extrapolación de estudios animales y preferencias de los médicos¹⁹ más que en guías o algoritmos terapéuticos¹⁷. Cuando se indican, tampoco hay acuerdo en cuál es el fármaco más idóneo para iniciar el tratamiento ni las dosis o la duración del mismo.

Habitualmente se administran asumiendo que la recuperación clínica a corto-medio plazo estará facilitada por el

aumento del gasto cardíaco y el tono vascular que se ha comprometido severamente por diversas condiciones clínicas.

VENA SAFENA INTERNA

La vena safena interna continúa siendo el conducto más ampliamente utilizado como injerto junto con la arteria mamaria interna izquierda. Esta vena tiene múltiples ventajas como conducto incluyendo la disponibilidad, accesibilidad, facilidad de disección, longitud y su versatilidad. También tiene limitaciones como la baja permeabilidad a largo plazo, varicosidades, esclerosis y las posibles complicaciones derivadas de su disección, fundamentalmente en pacientes con vasculopatía periférica.

Aunque el uso de la vena safena popularizó la cirugía de bypass coronario, la propensión a la oclusión es el talón de Aquiles del procedimiento.

La pérdida de beneficio clínico tras la revascularización derivado de la oclusión de los injertos venosos ha generado estrategias farmacológicas para maximizar la permeabilidad a corto y largo plazo. Estudios prospectivos randomizados han demostrado que la administración precoz de ácido acetilsalicílico reduce la oclusión del injerto durante el primer año tras la revascularización ^{20, 21}. El uso de aspirina 48 horas tras la cirugía reduce las complicaciones postoperatorias tempranas incluyendo la mortalidad, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, fallo renal, e infarto intestinal ²². Más recientemente se ha reconocido que los agentes hipolipemiantes reducen la progresión de la enfermedad coronaria tanto nativa como la arterioesclerosis del injerto, así como los eventos cardiovasculares secundarios. ^{23, 24} En el futuro la terapia génica podría permitir la modificación del endotelio venoso para disminuir la hiperplasia intimal. ^{25, 26} aunque hasta ahora los resultados no han sido alentadores.

FUNCIÓN DE LA PARED VASCULAR

La función de la pared vascular no sólo depende de su morfología y de los mecanismos neurohumorales que regulan la contracción y relajación del músculo liso vascular, sino también de otros mecanismos que derivan de la presencia de un endotelio intacto. El endotelio es la capa de células aplanadas que forma la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos, aunque frágil, desempeña un papel primordial en diversas funciones como angiogénesis, transporte capilar, fluidez de la sangre e interacción pared vascular-elementos sanguíneos ^{27, 28}. El endotelio normal elabora prostanoïdes y otras sustancias paracrinas que mantienen un equilibrio preciso entre vasodilatación y vasoconstricción, angiogénesis y de la agregación plaquetaria. El endotelio también es capaz de intervenir en el metabolismo de sustancias vasoactivas circulantes tales como la adrenalina, serotonina, bradiquinina y angiotensina ^{27, 28}.

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 ²⁹ .

Papel de las prostaglandinas

Los prostanoides son compuestos lábiles de vida media corta, sintetizados a partir del ácido araquidónico en respuesta a gran variedad de estímulos, como las hormonas o los autacoides ^{30,31} que interaccionan con receptores de membrana acoplados a proteínas G. El complejo formado produce la activación directa de la fosfolipasa C y fosfolipasa A₂ y/o el aumento de concentraciones citosólicas de Ca²⁺ que incrementarán los niveles de ácido

araquidónico ³². El ácido araquidónico, por la vía de la ciclooxigenasa, se metaboliza a prostaglandina G₂ y ésta a su vez a prostaglandina H₂.³³ Ambas son endoperóxidos inestables precursores de los prostanoides entre los que destacaremos la prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂), por su implicación en la regulación del tono vascular (Figura 1). La PGI₂ y el TXA₂ tienen acciones antagónicas ya que la primera es un potente agente vasodilatador y antiagregante plaquetario, mientras que el TXA₂ es un potente vasoconstrictor y agregante plaquetario.

Papel del óxido nítrico

En 1980 Furchgott y Zawadski ³⁴ 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 el endotelio mediante la frotación

de la capa íntima. La conclusión alcanzada fue aparentemente muy simple: la acetilcolina, actuando sobre receptores muscarínicos endoteliales estimulaba la liberación de un factor relajante. Este factor recibió el nombre de “Endothelium derived relaxing factor” (EDRF) o factor relajante derivado del endotelio.

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 ³⁵ y modular el efecto de los neurotransmisores liberados en las terminaciones nerviosas perivasculares de muchas especies animales ³⁶ y en el hombre ^{37,38}.

Entre los años 1986 y 1988 tres grupos independientes de investigadores ^{34, 39, 40} propusieron que el EDRF podría ser el óxido nítrico (NO).

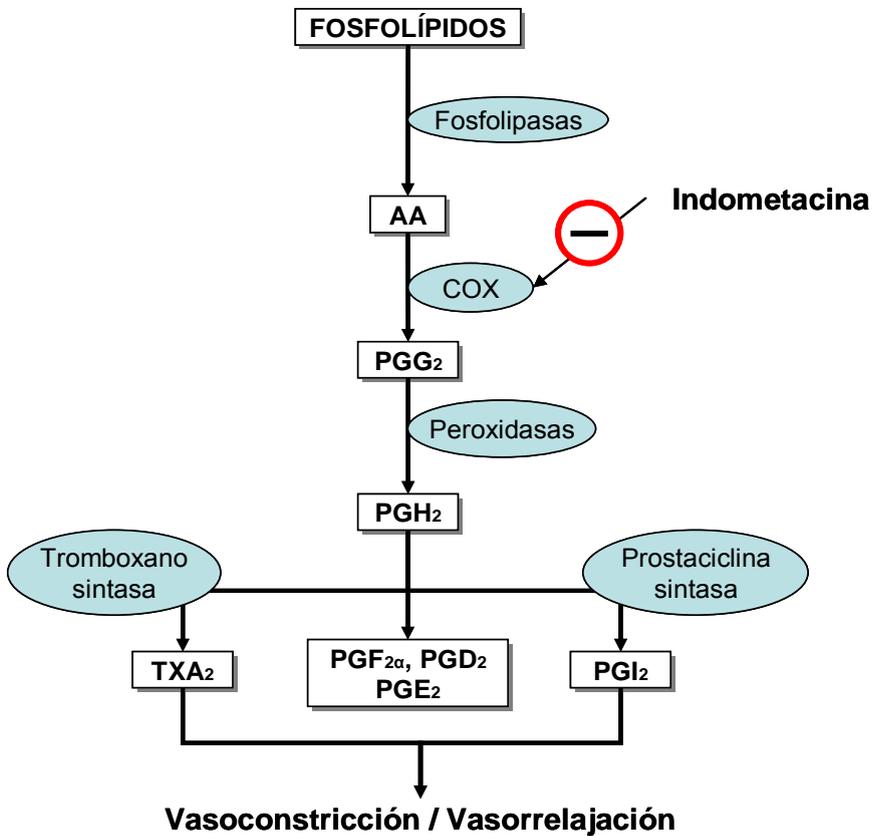


Figura 1: Biosíntesis del tromboxano A₂ (TXA₂) y de la prostaciclina (PGI₂). AA: ácido araquidónico, PG: prostaglandina.

El NO se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOS)⁴¹. La

liberación de NO aumenta al añadir L-arginina al medio de cultivo de células endoteliales y se inhibe en presencia del análogo de la L-arginina, N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) ⁴², un inhibidor de la óxido nítrico sintasa.

Las acciones del NO se realizan a través de la enzima guanilato ciclasa (GC) en la célula diana. La activación de la GC estimula la conversión de guanosín-5-trifosfato a guanosín 3',5' cíclico monofosfato (GMPc) (Figura 2) ⁴³. La acumulación de GMPc en la célula conduce a una serie de acontecimientos cuyo resultado es la disminución del calcio citosólico y la inducción de relajación ⁴⁴. Este mecanismo es el mismo que utilizan compuestos como la nitroglicerina y el nitroprusiato sódico (nitrovasodilatadores). Estos compuestos, cuya eficacia clínica se conoce desde hace mucho tiempo, liberan NO al músculo liso vascular, de forma espontánea o a través de una reacción enzimática ^{28, 44}. El NO regula además la actividad de varios

canales de potasio y dependiendo del lecho vascular, la hiperpolarización que produce el NO sobre la célula endotelial puede contribuir a su relajación ⁴⁵. El NO liberado por el endotelio vascular es uno de los principales responsables de la vasodilatación inducida por diversas sustancias (acetilcolina, bradiquinina, sustancia P, ionóforo de calcio A-23187) ^{46, 47}.

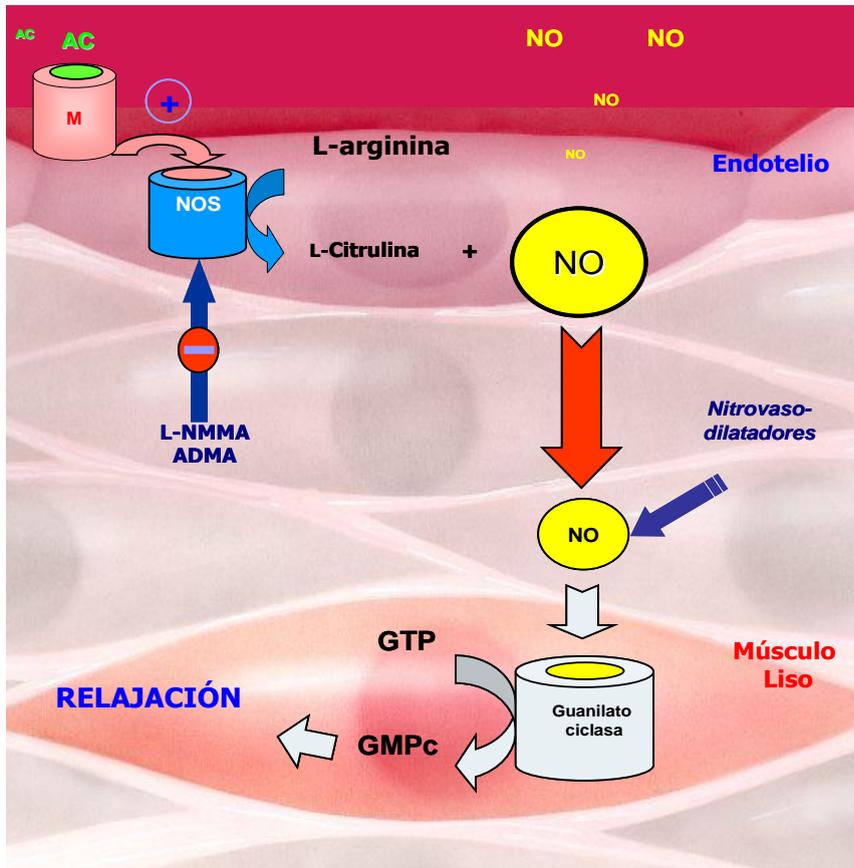


Figura 2: Esquema de la vía de formación de NO y relajación vascular a través del GMPc.

AC: Acetilcolina; *M:* receptor muscarínico; *NOS:* óxido nítrico sintasa
L-NMMA, N^G -monometil-L-arginina; *ADMA*, N^G,N^G -dimetilarginina asimétrica; *GTP*, guanosín-5-trifosfato; *GMPc*, guanosín 3',5' cíclico monofosfato; +, estímulo; -, inhibición.

Papel del factor hiperpolarizante derivado del endotelio

Diversos estudios han puesto de manifiesto que además del NO existen otros EDRF, la prostaciclina y otro factor que produce hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso por lo que se le ha denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) ⁴⁸⁻⁴⁹.

Se ha demostrado la participación conjunta del NO y del EDHF en la relajación dependiente del endotelio en arteria coronaria ⁵⁰ y cerebral humana ⁵¹. Además, parece que la participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente sea mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso ⁵² mientras que en vasos de mayor calibre, el principal responsable sería el NO. Es posible que en circunstancias normales el NO y el EDHF actúen sinérgicamente, de forma que cada factor potencie los efectos del otro ⁵³. Sin embargo, también se ha descrito que la síntesis de NO

inhibe la actividad vascular del EDHF, por lo que es posible que en diversas patologías en las que la síntesis de NO esté disminuida, como en la aterosclerosis, hipertensión arterial y la isquemia, la producción y los efectos del EDHF puedan incrementarse para paliar, en parte, la carencia de NO ⁵⁴. En estos casos el EDHF contribuiría en mayor medida a mantener la relajación dependiente del endotelio, adquiriendo más importancia en la homeostasia vascular. Se han propuesto diversas sustancias que podrían actuar como EDHF, entre ellas, el ácido epoxieicosatrienoico ⁵⁵⁻⁵⁷, el peróxido de hidrógeno ^{58, 59}, la anandamida ⁶⁰ o el péptido natriurético tipo C ⁶¹. Hay autores que relacionan el mecanismo de acción del EDHF con las uniones estrechas del músculo liso ^{62, 63}, pero la teoría más aceptada es la que implica a los canales de potasio ⁶⁴.

CANALES DE POTASIO. Tipos de canales de potasio

Los canales de potasio (canales K^+) son estructuras proteicas insertadas en la membrana plasmática celular que permiten el paso de K^+ a través de los mismos. Esta cadena de aminoácidos conforma una estructura espacial que sólo facilita la difusión de K^+ y no de otros iones. Los canales K^+ han sido descritos en todos los tejidos humanos. A su vez pueden existir varias clases de canales K^+ en una misma célula.

Los canales K^+ regulan funciones celulares vitales. Participan entre otras cosas en la secreción de insulina, activación linfocitaria, repolarización de la membrana plasmática cardíaca y nerviosa, como sensores de oxígeno y en la regulación del tono vascular arterial. En los últimos diez años, los conocimientos en este área han experimentado una verdadera revolución debido al avance de técnicas de electrofisiología y de biología molecular.

Se expresan varios tipos de canales de potasio, en las células musculares lisas vasculares y juegan un papel importante en la regulación del potencial de membrana y la contractilidad vascular. Cuando los canales de K^+ se abren, sale K^+ de la célula, en consecuencia, la membrana se hiperpolariza, los canales de Ca^{2+} se cierran y el Ca^{2+} intracelular disminuye produciendo relajación. Por el contrario, cuando se cierran los canales de K^+ , se produce despolarización y activación de canales de Ca^{2+} , entrada de Ca^{2+} y por tanto contracción del músculo liso ⁶⁵ (Figura 3).

Se han descrito cuatro tipos de canales de K^+ a nivel vascular: los sensibles a ATP, los rectificadores internos, los regulados por calcio ⁶⁶ y los regulados por voltaje.

Los **canales de K^+ sensibles al ATP (K_{ATP})** habitualmente están inhibidos por el ATP intracelular por lo que tienen pocas

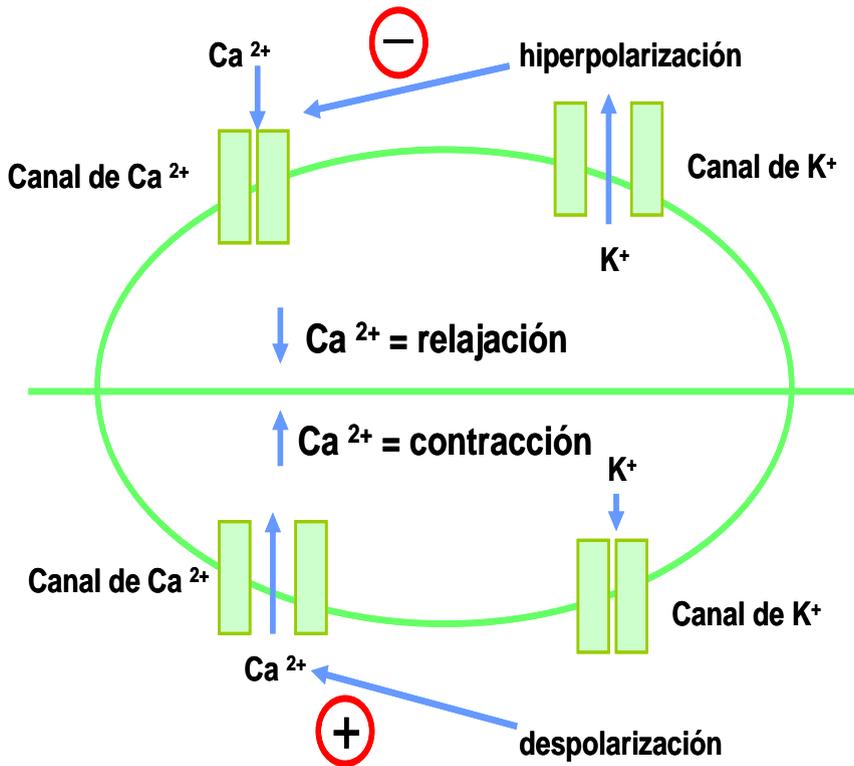


Figura 3: Interacción entre canales de K^+ y Ca^{2+} . Participación de éstos en la contracción y relajación vascular

probabilidades de estar abiertos en condiciones basales. La glibenclamida es un inhibidor selectivo de estos canales, generalmente no tiene efectos sobre el tono vascular, aunque hay algunas excepciones ⁶⁷⁻⁶⁹. Diversos fármacos pueden inducir vasodilatación por activación de los canales K_{ATP} ^{67, 70, 71} y por tanto influir en el mantenimiento del tono vascular (lemakalim, pinacidil, nicorandil...). Hay algunos estímulos vasodilatadores endógenos como la hipoxia, la acidosis o sustancias que incrementan los niveles intracelulares de AMPc, como la adenosina, la prostaciclina o la noradrenalina, que pueden ejercer sus efectos vasculares en parte por la activación de los canales K_{ATP} . ^{70, 71} Por ejemplo, en el *shock* séptico, la hipoxia disminuye los niveles de ATP, causando la apertura de los canales K_{ATP} , la membrana se hiperpolariza y el músculo liso se relaja, lo que se suma a los mecanismos clásicos de vasodilatación en el *shock* séptico.

Los **canales rectificadores de K^+ (K_{IR})** son activados por hiperpolarización e inhibidos por bario. Se postula que participan en la vasodilatación por hiperkalemia. Al bloquear los canales K_{IR} la corriente de entrada de K^+ a la célula muscular lisa es mayor que la de salida ^{67, 70, 72}

En condiciones basales, un pequeño incremento sobre la concentración extracelular de K^+ (de 3 a 5 mM) produce un aumento de la salida de K^+ a través de los canales K_{IR} . Cuando el incremento es ligeramente mayor a 5 mM, pero menor que 10 mM en el medio extracelular, como ocurre durante la activación neuronal o muscular ⁷³⁻⁷⁴ puede ocasionar una hiperpolarización y por tanto una relajación debida a la salida de K^+ a través de los canales K_{IR} . ⁷⁵⁻⁷⁶

El bloqueo selectivo de estos canales usando cloruro de bario causa despolarización y vasoconstricción ^{74,75-77}, lo que indica que los canales K_{IR} pueden estar activos en condiciones basales.

Los **canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v)** del músculo liso vascular se activan con la despolarización de la membrana. La 4-aminopiridina (4-AP) es un fármaco ampliamente utilizado como bloqueante de los canales K_v . Al incubar un segmento vascular con 4-AP se produce una despolarización y contracción del músculo liso vascular sugiriendo que la actividad de los canales K_v existe en condiciones basales en algunos vasos sanguíneos⁷⁸⁻⁷⁹. Los canales K_v pueden ser activados por AMPc^{80, 81} o por NO vía GMPc^{82, 83} y pueden ser bloqueados por la proteína quinasa C en algunos lechos vasculares.⁸⁴

Los **canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca})** se activan por el Ca^{2+} intracelular, las proteínas quinasas A y G y por la despolarización de la membrana celular. Son especialmente abundantes en las células de la musculatura lisa vascular^{70, 71}. Se activan en respuesta tanto a agentes vasoconstrictores como dilatadores.⁶⁶

La liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico regula la función de los canales K_{Ca} y por tanto el potencial de membrana y el tono vascular ^{69, 85} (Figura 4). La entrada de calcio produce contracción del músculo liso vascular. El aumento de calcio intracelular determina que este ión se una al receptor de rianodina que se encuentra en el retículo sarcoplásmico e induzca la liberación de más calcio; con ella se activan los canales K_{Ca} , cuya apertura permite la salida de K^{+} ⁶⁶. La importancia de este fenómeno radica en que la contracción causa salida de potasio que hiperpolariza la membrana y por tanto atenúa la contracción del músculo liso. Los receptores de rianodina están en íntimo contacto con los canales K_{Ca} y por lo tanto permiten esta retroalimentación negativa. ⁸⁵

Los canales K_{Ca} pueden ser de tres tipos: de alta conductancia, intermedia y baja ^{86, 87} y tienen bloqueantes específicos (iberiotoxina, charibdotoxina y apamina). Hay

fármacos como el tetraetilamonio (TEA) que inhibe los tres tipos de canales K_{Ca} .

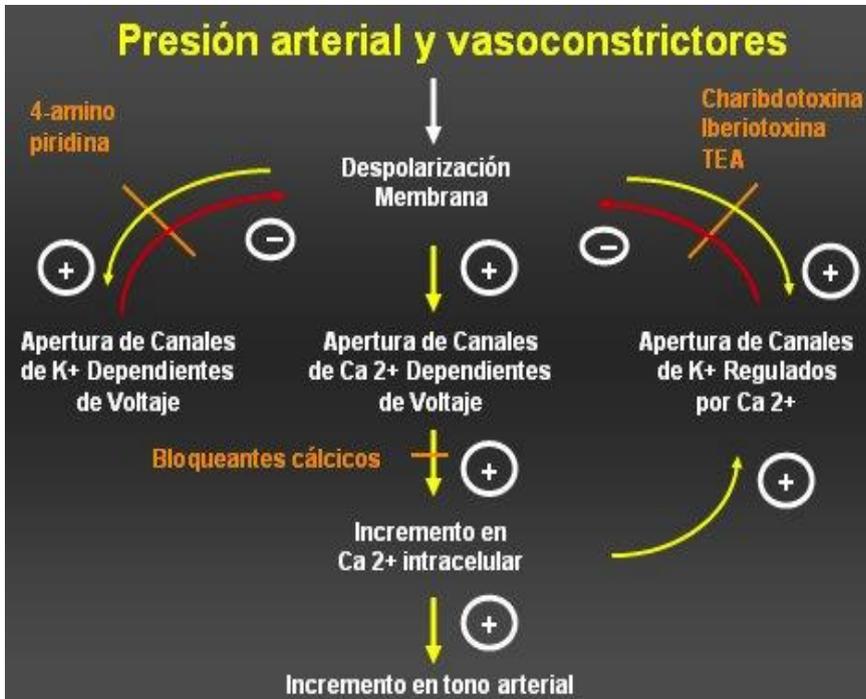


Figura 4. Relación entre los canales de potasio y calcio con la regulación de la presión arterial

CANALES DE CALCIO. Clasificación de los canales de calcio

La concentración libre de calcio (Ca^{+2}) en el citosol de cualquier célula es extremadamente baja ($<10^{-7}$ M), mientras que la concentración en el medio extracelular y en el retículo endoplásmico es considerablemente mayor (10^{-3} M). Esta diferencia genera un fuerte gradiente de concentración que tiende a permitir el paso de Ca^{+2} al citosol a través de ambas membranas.

El flujo de Ca^{+2} a través de la membrana plasmática está regulado por una gran familia de canales, los cuales se abren o cierran en respuesta a un estímulo determinado, el cual puede provenir de la interacción entre la proteína que conforma el canal y nucleótidos cíclicos, de la unión de neurotransmisores con receptores de canal o bien de cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana.

A los canales de calcio que se activan por cambios en el

potencial de membrana se les ha denominado como canales de calcio activados por voltaje (VGCC), que son la vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables (células musculares, neuronas y células de glándulas neuroendocrinas). Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones Ca^{2+} a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana y el crecimiento de neuritas ^{88, 89}

Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca^{2+} ⁹⁰ denominados T, L, N, P, Q y R. Estos canales se pueden clasificar atendiendo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas; sin embargo, la clasificación más utilizada se basa en el rango de voltaje necesario para su activación, clasificándolos en dos categorías: canales de Ca^{2+} de bajo y de alto umbral. El canal de tipo T es el único canal de Ca^{2+} de bajo umbral descrito hasta la actualidad, mientras que los canales de tipo L, N, P, Q y R han sido

caracterizados como canales de Ca^{2+} de alto umbral debido a que se requieren grandes despolarizaciones para su activación.

También se pueden clasificar de una forma general en dos familias: canales sensibles a dihidropiridinas (DHP) y canales insensibles a DHP.

Canales de calcio tipo T

Descritos originalmente en neuronas sensoriales de vertebrados, los canales de Ca^{2+} tipo T han sido encontrados en una gran variedad de células excitables y no excitables (neuronas, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético durante el desarrollo, fibroblastos, osteoblastos, astrocitos, pituitaria, etc.) y se encuentran ausentes en células cromafines y en neuronas simpáticas. Su función está relacionada principalmente con la actividad rítmica (marcapasos) y la entrada de Ca^{2+} ⁹¹

Canales de calcio tipo L

Los canales de Ca^{2+} de tipo L son los mejores estudiados y se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en la mayoría de las células no excitables. Constituyen la principal vía de entrada de iones Ca^{2+} en las células de los músculos cardíaco, esquelético y liso, y, contribuyen de forma significativa a controlar la secreción de neurotransmisores y los mecanismos de excitación, contracción en las células neuroendocrinas, en algunas preparaciones neuronales y en las células de los músculos cardíaco y esquelético.

La farmacología de este tipo de canales es de gran importancia debido al éxito alcanzado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (angor pectoris, hipertensión arterial), neurológicas, gastrointestinales, etc.⁹² con fármacos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de tipo L, denominados usualmente "antagonistas del calcio"⁹³.

Canales de calcio tipo N

Los canales de tipo N, se denominan así porque parecen ser específicos del sistema nervioso y de tejidos relacionados con éste,^{94, 95}. Se encuentran fundamentalmente en las neuronas presinápticas y contribuyen a la liberación de neurotransmisores⁹⁶. Actualmente, la mejor forma de caracterizarlos es utilizando criterios farmacológicos debido a su insensibilidad a las DHP y a su bloqueo por diferentes conotoxinas (conotoxina MVIIA, conotoxina GVIA).

Canales de calcio tipo P

Se denominan canales de tipo P porque se describieron por primera vez en las células de Purkinje del cerebelo^{97, 98}; sin embargo, su caracterización se realizó tanto en células de Purkinje como en la sinapsis gigante del calamar.

Los canales de tipo P parecen ser los canales más

ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de mamíferos, y también se ha descrito su existencia en: retina, hipófisis, células cromafines, etc.⁹⁷. Respecto a su función, se le ha relacionado con la generación de actividad intrínseca, la modulación de la actividad neuronal y liberación de neurotransmisores⁹⁹.

Canales de calcio tipo Q

Se ha sugerido que este tipo de canal jugaría un papel predominante en la neurotransmisión glutamatérgica debido a que tanto la transmisión sináptica como la liberación de glutamato inducida por despolarización son inhibidas por la conotoxina IVA pero sólo a elevadas concentraciones^{90, 100}.

HIPÓTESIS

La administración de drogas vasoactivas y la propia cirugía de revascularización puede alterar la respuesta vascular de los injertos utilizados en el bypass coronario disminuyendo su capacidad para dilatar y por tanto favoreciendo el vasoespasmo. Esto podría producir eventos isquémicos agudos tras la revascularización coronaria y disminuir la viabilidad a largo plazo de los injertos. Aunque en la respuesta vascular están involucrados diferentes tipos de canales iónicos, en especial canales de K^+ , pocos son los estudios realizados en vasos humanos utilizados como injertos en el bypass aortocoronario.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de factores relajantes en la modulación de la respuesta vasoconstrictora adrenérgica en la vena safena interna humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la respuesta vascular contráctil a la noradrenalina endógena y exógena en la vena safena y la participación en esta respuesta de prostaglandinas y NO.

Objetivos

2. Estudiar el papel de diferentes canales de potasio en la respuesta contráctil tanto a la noradrenalina administrada exógenamente como a la liberada por la estimulación eléctrica.

3. Estudiar el papel de los canales de calcio sobre la respuesta inducida por los bloqueantes de los canales de potasio en la respuesta adrenérgica endógena y exógena.

MATERIAL Y MÉTODOS

PROCEDENCIA DE LOS SEGMENTOS

VENOSOS

En el desarrollo del trabajo se utilizaron segmentos de vena safena de 40 pacientes, 29 hombres y 11 mujeres (rango de edad 48-82 años).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en segmentos (3 milímetros de longitud) de vena safena interna obtenidos durante cirugía abierta de revascularización coronaria en el Hospital Clínico de Valencia (Servicio de Cirugía Cardiovascular).

El procedimiento para la preparación quirúrgica del injerto sigue el método tradicional. La vena safena se disecciona cuidadosamente y se ligan las ramas. Se mide la longitud y el segmento de vena redundante, se coloca inmediatamente en una solución de suero salino frío y se traslada al laboratorio.

La mayor parte de los vasos se utilizó en el mismo día de la cirugía y todos los tejidos se utilizaron dentro de las siguientes 18 horas.

Este estudio fue aprobado por el comité ético de nuestra institución y se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente antes del estudio.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Preparación de las muestras

La limpieza de los segmentos procedentes de la vena safena se realizó en una placa de Petri con solución salina (NaCl 0,9%) fría, bajo una lupa de disección (Wild M3C) iluminada con luz fría. Los segmentos venosos se cortaron en anillos de 3 milímetros de longitud y se montaron en un sistema para el registro de la tensión

isométrica (Figura 5). La preparación experimental consiste en introducir dos alambres rígidos (200 μm de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres está unido a un soporte que a su vez se fija a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conecta a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento vascular, con los alambres introducidos en su luz, se coloca en un baño de órganos que contiene 4 ml de solución fisiológica cuya composición es la siguiente (en mM): NaCl 115; KCl 4,6; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01.

Esta solución se equilibra con una mezcla gaseosa (95% O_2 y 5% CO_2) que proporciona un pH entre 7,3 - 7,4. La temperatura de la solución se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permite aplicar al anillo vascular la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un

ordenador Macintosh utilizando un software Chart v3.4/s y un sistema de adquisición de datos MacLab /8e (AD Instruments).

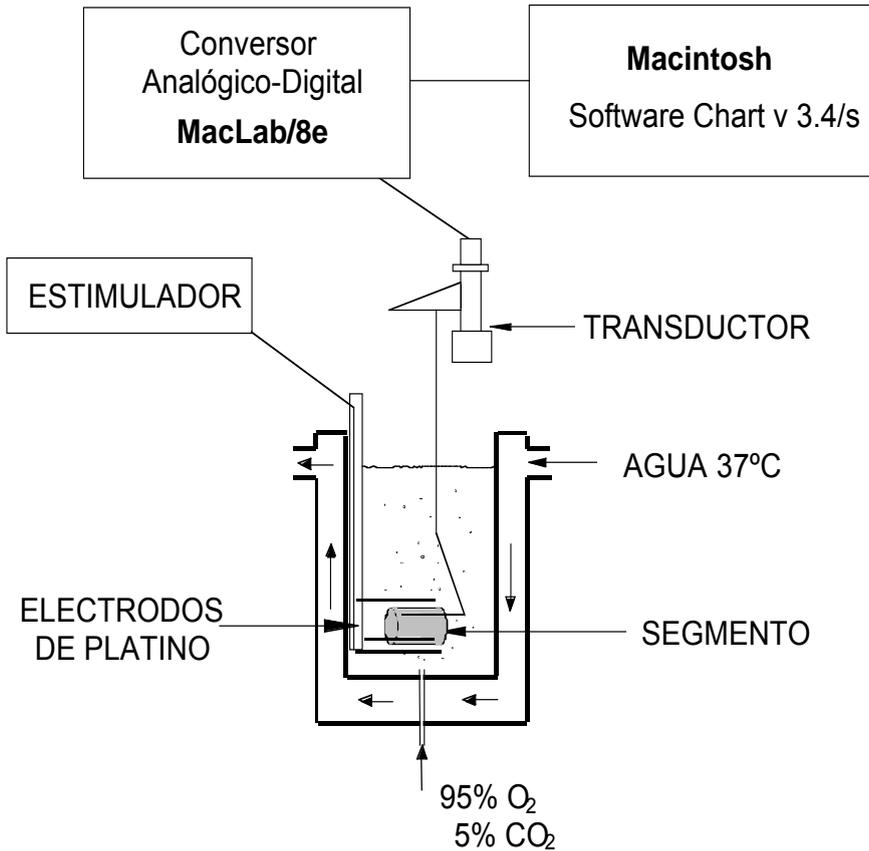


Figura 5. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.

La integridad funcional del endotelio se comprobó al principio de cada experimento observando la presencia de relajación provocada por bradiquinina (10^{-7} - 10^{-6} M) en anillos previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} - 3×10^{-7} M). Se descartaron aquellas que no relajaban más de un 70%.

2. 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 inducida por el KCl (120 mM) después de exponer los anillos venosos a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil al KCl se consideró como la tensión óptima de reposo.

La tensión pasiva óptima para los segmentos de vena safena interna fue de 3 g.

Para aplicar la tensión pasiva adecuada, los segmentos se distendieron separando los alambres mediante el tornillo micrométrico; puesto que la respuesta inmediata a la distensión es la relajación, la tensión se reajustó periódicamente hasta alcanzar una tensión de reposo estable, manteniéndose a ese nivel de tensión durante 1 hora de acomodación, previo a la realización del experimento.

Una vez alcanzada la tensión basal estable, se obtuvieron las curvas concentración-respuesta acumulativamente, de forma que la concentración del fármaco en el baño cuando se aplicó una dosis era la resultante de la suma de esta última con las administradas anteriormente. El cambio de concentración se llevó a cabo cuando la dosis anterior había desarrollado su efecto máximo.

3. Curvas concentración - respuesta

Se construyeron curvas concentración-respuesta al cloruro potásico (5-120 mM) para estudiar la capacidad contráctil del músculo liso independiente de receptor.

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en segmentos de vena safena en las siguientes condiciones:

- En ausencia de inhibidores (respuesta control).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) para inhibir la síntesis de prostaglandinas.
- En presencia de L-NMMA (10^{-4} M) para inhibir la producción de NO.
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M).

Para estudiar la naturaleza de los canales de K^+ , se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina. En

estos experimentos, la curva se obtuvo siempre previa inhibición de la COX y de la NOS con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M) respectivamente. En estas condiciones se administraron diferentes bloqueantes de los canales de K^+ :

- Iberiotoxina (10^{-7} M), un bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia.
- Charibdotoxina (10^{-7} M), bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de intermedia y alta conductancia.
- Apamina (10^{-6} M 10^{-7} M), bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia.
- Glibenclamida (10^{-5} M), bloqueante selectivo de los canales de K^+ sensibles a ATP.
- 4- aminopiridina (4-AP) (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M) bloqueante selectivo de los canales de K^+ voltaje dependientes.

Para estudiar el papel del calcio en la potenciación de la contracción inducida por los diferentes canales de potasio, las mismas condiciones detalladas anteriormente se realizaron en presencia y en ausencia de nifedipino (10^{-6} M), un bloqueante de los canales de calcio tipo L.

Todas las curvas se realizaron utilizando segmentos venosos diferentes. Las curvas que se realizaron en presencia de los distintos inhibidores se construyeron tras un período de incubación de 20 minutos.

4. Curvas frecuencia-respuesta

El estímulo eléctrico fue aplicado mediante dos electrodos de platino, situados a 5 mm uno del otro, y entre los cuales se localiza el segmento venoso. Los electrodos se conectaron a un estimulador *Grass S88* (Grass Instruments, Quincy, U.S.A.). La

relación entre la frecuencia aplicada y la respuesta obtenida fue estudiada en un rango de frecuencias comprendido entre 1 y 4 Hz, con estímulos de 15 V (voltaje supramáximo) de 0,2 ms de duración, durante 15 s.

Para estudiar la naturaleza de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico, los segmentos venosos se incubaron durante 10 minutos con tetrodotoxina (10^{-6} mol/L)^{34,101,102} un bloqueante de la conducción nerviosa, guanetidina (10^{-6} M), un bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica o prazosín (10^{-6} M), un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos. Como control, en otro grupo de segmentos se realizó una segunda secuencia de estímulos en ausencia de los antagonistas.

La respuesta contráctil al estímulo eléctrico, se estudió en vena safena en las siguientes condiciones:

- En ausencia de inhibidores (respuesta control).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M).

- En presencia de L-NMMA (10^{-4} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) e iberiotoxina (10^{-7} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y charibdotoxina (10^{-7} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y apamina (10^{-6} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y glibenclamida (10^{-5} M).
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), y 4-aminopiridina a diferentes concentraciones.

Para estudiar el papel del calcio en la potenciación de la contracción inducida por los diferentes canales de potasio, se realizaron curvas frecuencia-respuesta en presencia de nifedipino, (10^{-6} M) en caso de existir tal potenciación.

En el caso de la potenciación al estímulo eléctrico observada con la incubación de 4-aminopiridina y con el fin de estudiar la naturaleza de este efecto, se realizaron experimentos en las siguientes condiciones:

- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y 4-aminopiridina como control.
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), 4-aminopiridina (10^{-5} M) y conotoxina MVIIA (10^{-8} M), bloqueante específico de los VGCC tipo N
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), 4-aminopiridina (10^{-5} M) y conotoxina MVIIC (10^{-7} M), bloqueante específico de los VGCC tipo Q.

- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), 4- aminopiridina (10^{-5} M) y conotoxina GVIA (10^{-7} M), bloqueante específico de los VGCC tipo N y L
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), 4- aminopiridina (10^{-5} M) y conotoxina IVA (10^{-8} M), bloqueante específico de los VGCC P.

Las curvas frecuencia-respuesta en condiciones control y tras incubar con los distintos bloqueantes se realizaron en el mismo segmento.

Los inhibidores fueron añadidos al baño de órganos 20-30 minutos antes de la iniciación de las curvas frecuencia- respuesta.

5. Fármacos y soluciones

Cloruro de bradiquinina, clorhidrato de noradrenalina, acetato de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), indometacina, iberiotoxina, charibdotoxina, apamina, glibenclamida, nifedipina, tetrodotoxina, sulfato de guanetidina, clorhidrato de prazosín, 4-aminopiridina, conotoxina MVIIA, conotoxina MVIIC, conotoxina GVIA y conotoxina IVA. Todos ellos distribuidos por Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO). Cloruro potásico distribuido por Panreac.

Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01 %. Las diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados se indican como la media \pm error estándar. La contracción se expresa en porcentaje de la respuesta al KCl (120 mmol/L).

La concentración de agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. A partir de estos valores se calculó la media geométrica de la CE_{50} y su intervalo de confianza del 95% para cada grupo de experimentos. Los resultados se expresan como el valor de $pD_2 \pm$ el error estándar. $pD_2 = -\text{Log } CE_{50}$

En cada grupo de experimentos, n indica el número de individuos.

La comparación de las respuestas de los segmentos venosos en las distintas condiciones estudiadas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre grupos fueron

estimadas por el test de la t de Student. Las comparaciones de los valores, obtenidos en los mismos segmentos venosos, se realizaron por el test de la t de Student pareada. Cuando los controles fueron segmentos venosos distintos a los tratados, los valores se compararon con la t de Student no pareada. En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESPUESTA AL CLORURO POTÁSICO

La administración de KCl (5-120 mM) produjo contracción dependiente de la concentración (Figura 6). Tras una primera fase de contracción exponencial, se alcanzó un tramo asintótico a partir de 60 mM, valor al que prácticamente corresponde la respuesta máxima (E_{max}).

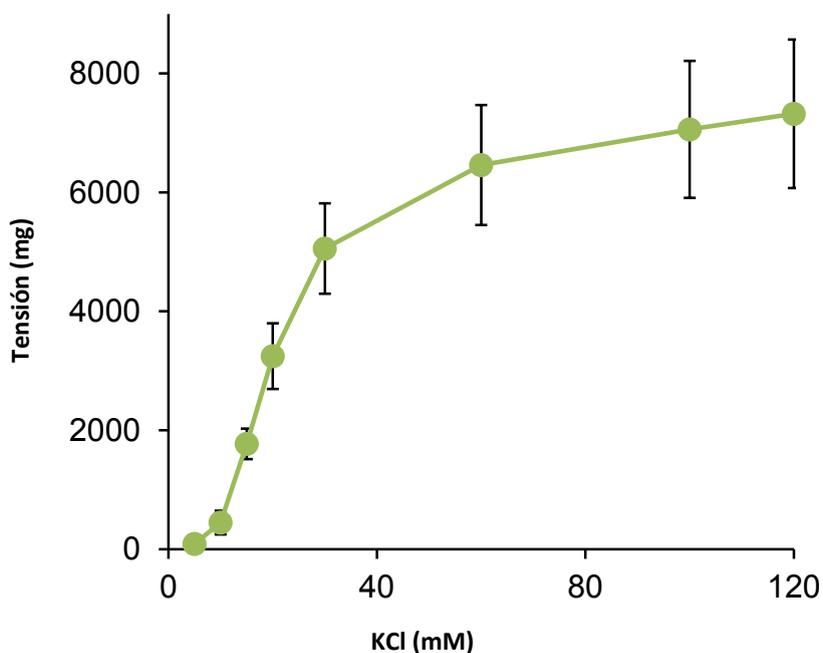


Figura 6. Curva concentración - respuesta al KCl.

RESPUESTA A LA NORADRENALINA

La noradrenalina provocó una contracción en los segmentos de vena safena que fue dependiente de la concentración, como se muestra en la figura 7.

1. PARTICIPACIÓN DE PROSTAGLANDINAS

Para estudiar la posible intervención de prostaglandinas en la respuesta contráctil inducida por noradrenalina, se incubaron los segmentos de vena safena con indometacina 10^{-5} M. Este inhibidor no modificó la curva concentración-respuesta a la noradrenalina, ni en su efecto máximo, ni en su valor pD_2 (Figura 7, tabla 1), por lo que no parece probable que la noradrenalina induzca la liberación de prostaglandinas.

2. PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina, en presencia de un inhibidor de la NOS, para valorar la liberación de NO. La incubación con L-NMMA (10^{-4} M) desplazó la curva concentración-respuesta a la izquierda, aumentando significativamente ($p < 0.05$) tanto el valor de pD_2 como el efecto máximo ($p < 0.05$) (Figura 8 y tabla 1). Estos resultados indican que la noradrenalina es capaz de inducir la liberación de NO en segmentos de vena safena.

La administración conjunta de indometacina más L-NMMA no provocó mayor respuesta que la administración de L-NMMA.

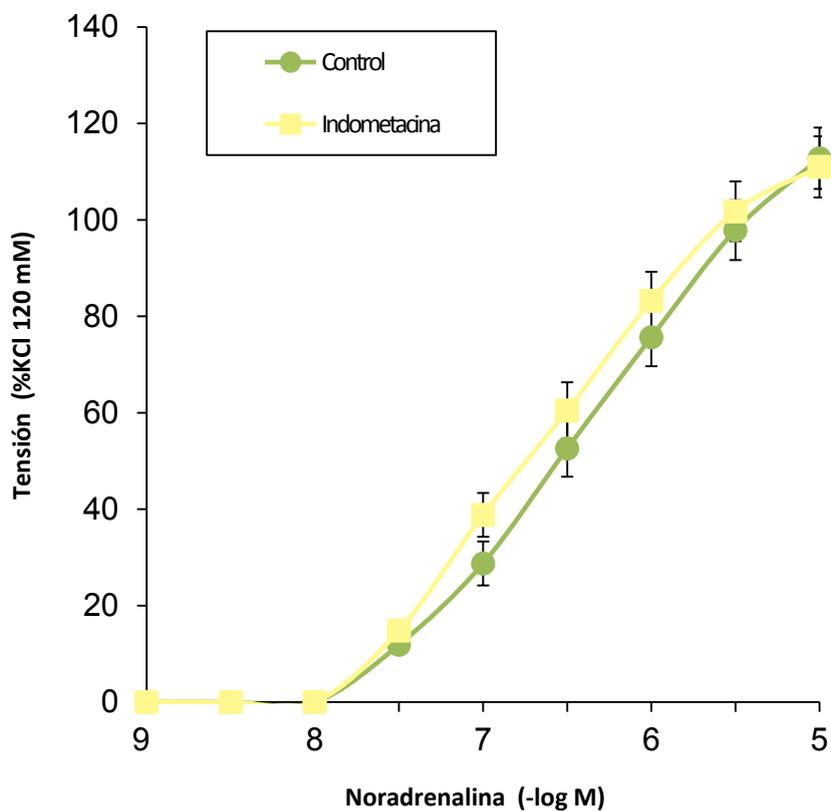


Figura 7. Curvas concentración - respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de indometacina ($10^{-5} M$)

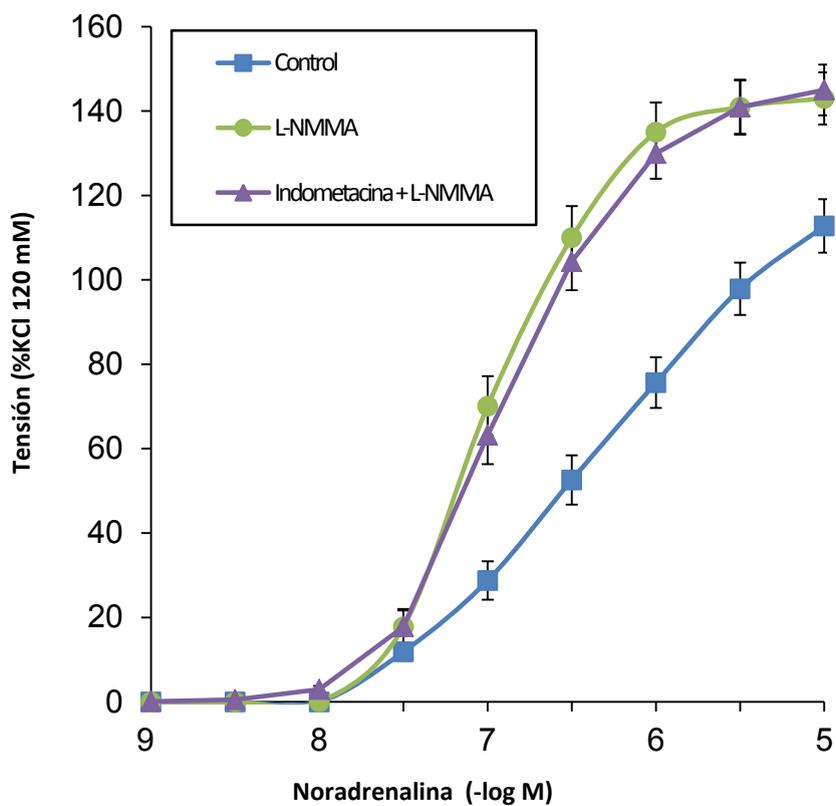


Figura 8. Curvas concentración respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de L-NMMA ($10^{-4} M$) e indometacina ($10^{-5} M$) más L-NMMA ($10^{-4} M$).

Tabla 1. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.), y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de indometacina o L-NMMA o ambos en segmentos de vena safena.

Noradrenalina	$PD_2 + ee$	$E_{max} + ee$	n
Control	6,44 + 0,05	110 + 5	18
Indometacina 10^{-5} M	6,22 + 0,07	111 + 6	12
L-NMMA 10^{-4} M	6,99 + 0,08*	143 + 6*	14
Indometacina 10^{-5} M + L-NMMA 10^{-4} M	6,93 + 0,09*	145 + 6*	17

* $p < 0,05$ comparado con el control. n, numero de pacientes

3. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K^+ ACTIVADOS POR CALCIO

Iberiotoxina (10^{-7} M), charibdotoxina (10^{-7} M) o apamina (10^{-6} M) no producen efectos sobre los segmentos venosos en condiciones basales. En algunos experimentos iberiotoxina produjo

una pequeña contracción (entre 300 y 500 mg) que desaparece a los pocos minutos recuperando los niveles de tensión basal.

En este grupo de experimentos se tomó como control la respuesta a la noradrenalina de segmentos incubados con indometacina y L-NMMA para descartar los efectos mediados por prostaglandinas y NO.

La curva concentración-respuesta a la noradrenalina se desplazó a la izquierda en presencia de iberiotoxina (10^{-7} M) y charibdotoxina (10^{-7} M) pero no en presencia de apamina (10^{-6} M) (Figura 9).

La tabla 2 muestra los valores de pD_2 y del efecto máximo de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina incubadas con los diferentes bloqueantes de los canales de K^+ para los segmentos venosos .

Estos resultados ponen de manifiesto la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia en los segmentos venosos en respuesta a la noradrenalina.

Tabla 2. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.), y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de iberiotoxina, charibdotoxina, apamina y glibenclamida.

Noradrenalina	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n
Control	$6,93 \pm 0,09$	145 ± 6	17
Iberiotoxina 10^{-7} M	$7,20 \pm 0,08^*$	157 ± 5	10
Charibdotoxina 10^{-7} M	$7,23 \pm 0,07^*$	147 ± 10	10
Apamina 10^{-6} M	$6,83 \pm 0,11$	140 ± 3	7
Glibenclamida 10^{-5} M	$7,01 \pm 0,10$	150 ± 8	8

* $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

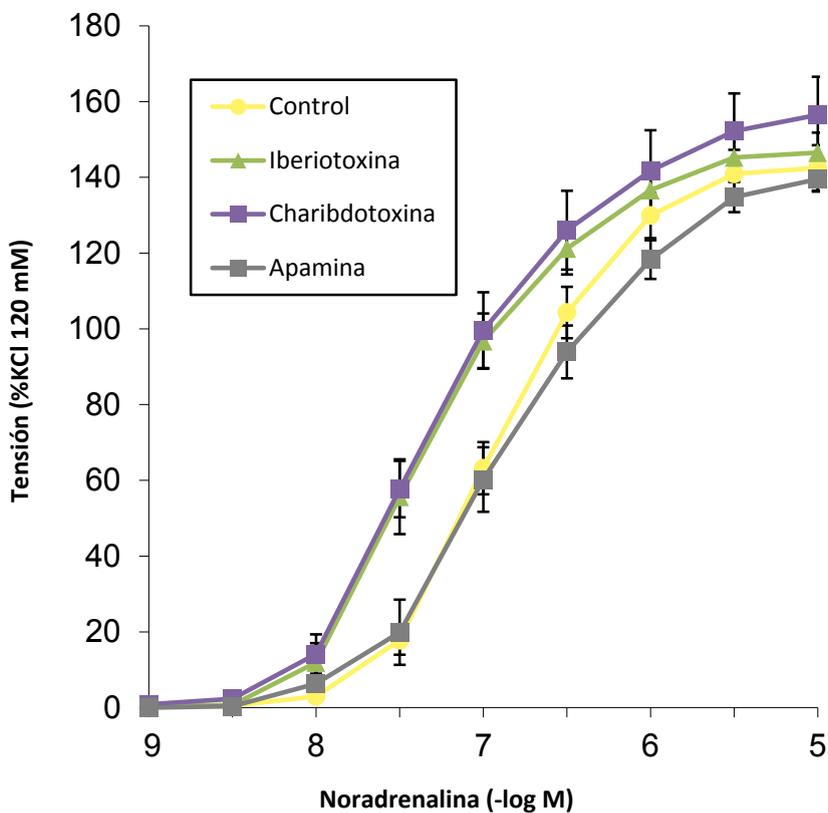


Figura 9. Curva concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de iberiotoxina (10^{-7} M), charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M). Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

4. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K⁺ SENSIBLES A ATP

En este grupo de experimentos de nuevo se tomó como control la respuesta a la noradrenalina de segmentos incubados con indometacina y L-NMMA para descartar los efectos mediados por prostaglandinas y NO.

La curva concentración-respuesta a la noradrenalina no cambió en presencia de glibenclamida (10^{-5} M), ni el valor de pD_2 ni el E_{max} se vieron alterados con la administración de este bloqueante (Figura 10, tabla 2). Estos resultados ponen de manifiesto que estos canales no participan en la respuesta de la vena safena a la noradrenalina.

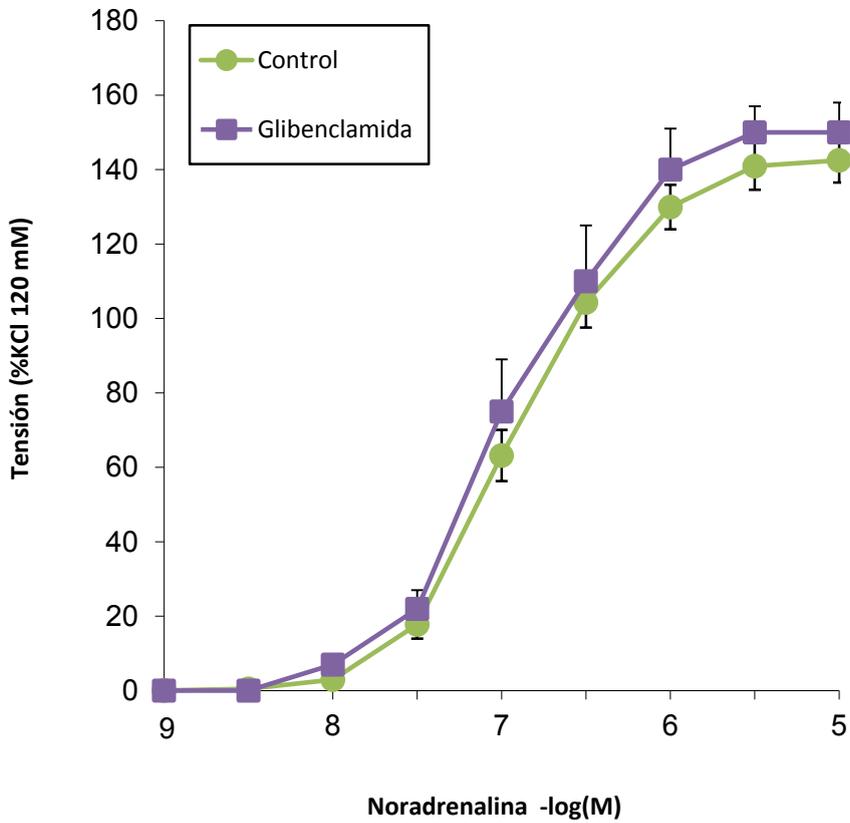


Figura 10. Curva concentración - respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de glibenclamida ($10^{-5} M$). Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina ($10^{-5} M$) y L-NMMA ($10^{-4} M$).

5. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K⁺ VOLTAJE DEPENDIENTES

La 4-aminopiridina (10^{-6} M – 10^{-3} M) no modifica la respuesta a la noradrenalina de los segmentos de vena safena, lo cual descarta la participación de los canales de K⁺ dependientes de voltaje en la contracción inducida por noradrenalina (Figuras 11 a-d, tabla 3). Todos los experimentos se realizaron en segmentos preincubados con indometacina y L-NMMA.

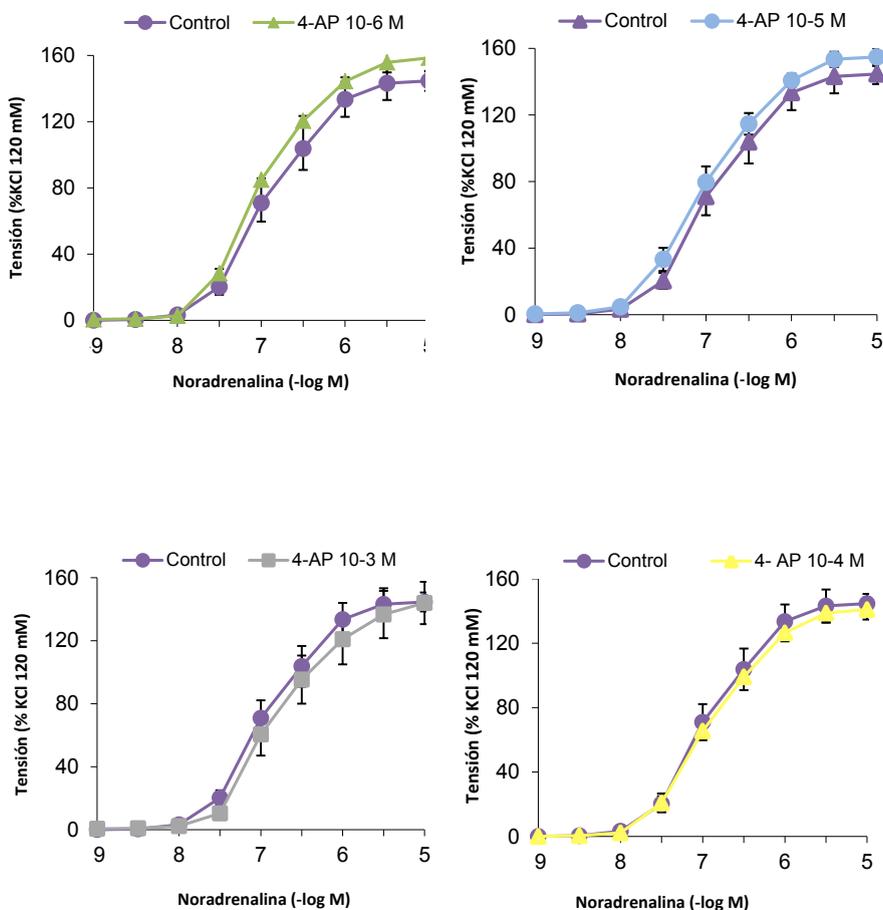
En conjunto estos resultados ponen de manifiesto que la respuesta contráctil a la noradrenalina en la vena safena humana esta modulada en parte por la participación de canales de K⁺ dependientes del Ca⁺² de alta conductancia. El bloqueo selectivo de estos canales produce una potenciación de la respuesta a la noradrenalina.

Tabla 3. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.), y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de 4-aminopiridina.

Noradrenalina	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e	n
Control	$6,93 \pm 0,09$	145 ± 6	17
4-Aminopiridina $10^{-6}M$	$7,04 \pm 0,05$	159 ± 8	6
4-Aminopiridina $10^{-5}M$	$7,02 \pm 0,09$	155 ± 5	9
4-Aminopiridina $10^{-4}M$	$6,93 \pm 0,05$	141 ± 6	8
4-Aminopiridina $10^{-3}M$	$6,75 \pm 0,13$	144 ± 13	11

n = número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina ($10^{-5}M$) y L-NMMA ($10^{-4}M$).

Resultados



Figuras 11 a-d. Curvas concentración - respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de 4-aminopiridina. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

6. PAPEL DE LOS CANALES DE CALCIO

Para estudiar la naturaleza de esta potenciación incubamos con nifedipino los segmentos con iberiotoxina y charibdotoxina y se repitieron las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina (figura 12 , tabla 4).

El nifedipino disminuye la respuesta contráctil a la noradrenalina, indicando que la contracción inducida por noradrenalina es en parte mediada por la entrada de Ca^{+2} a través de canales sensibles a DHP. En presencia de nifedipino no se produce la potenciación inducida por iberiotoxina o charibdotoxina indicando la participación de los canales de calcio tipo L en esta respuesta.

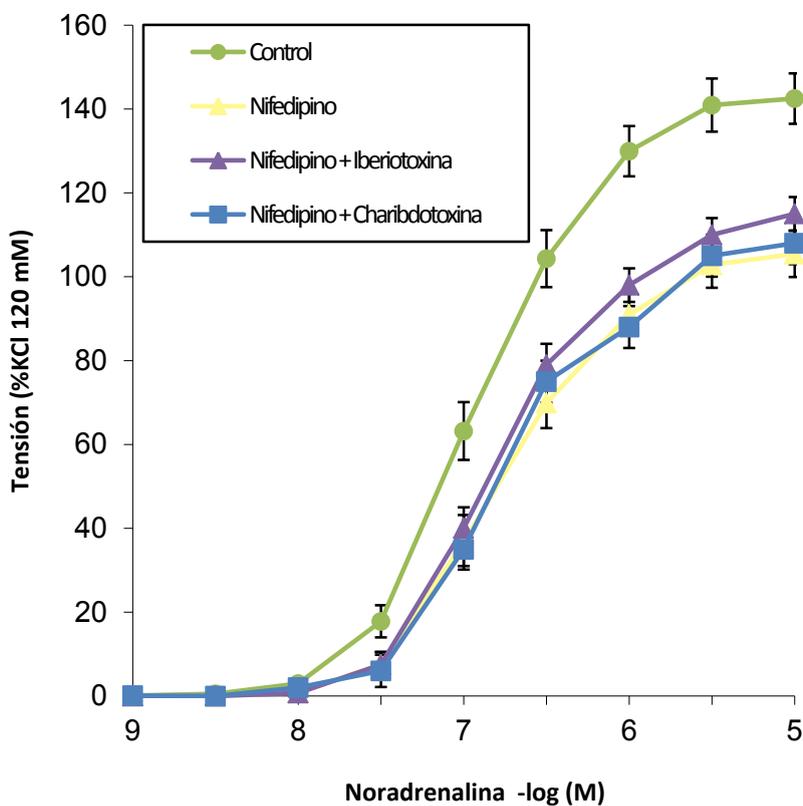


Figura 12. Efecto de nifedipino (10^{-6} M) en la curva concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control), y en presencia de nifedipino, nifedipino con iberiotoxina (10^{-7} M), nifedipino con charibdotoxina (10^{-7} M). Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 4. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.), y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control), y en presencia de nifedipino, nifedipino con iberiotoxina, nifedipino con charibdotoxina

Noradrenalina	$PD_2 \pm ee$	$E_{max} \pm ee$	n
Control	$6,93 \pm 0,09$	143 ± 6	5
Nifedipino 10^{-6} M	$6,77 \pm 0,05^*$	$105 \pm 5^*$	5
Nifedipino + Iberiotoxina 10^{-7} M	$6,78 \pm 0,08^*$	$115 \pm 4^*$	5
Nifedipino + charibdotoxina 10^{-7} M	$6,76 \pm 0,09^*$	$108 \pm 5^*$	5

* $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

RESPUESTA AL ESTÍMULO ELÉCTRICO

El estímulo eléctrico (15 V, 0,2 ms de duración, 1, 2 y 4 Hz durante 15 s), indujo contracción dependiente de la frecuencia en los segmentos venosos. Esta contracción fue abolida al incubar con

tetrodotoxina, guanetidina o prazosín, (todos a la concentración de 10^{-6} M), en todo el rango de frecuencias estudiado, lo cual indica que la contracción inducida por el estímulo eléctrico es debida a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares y a la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos y no a un estímulo directo sobre el músculo liso vascular (Figura 13).

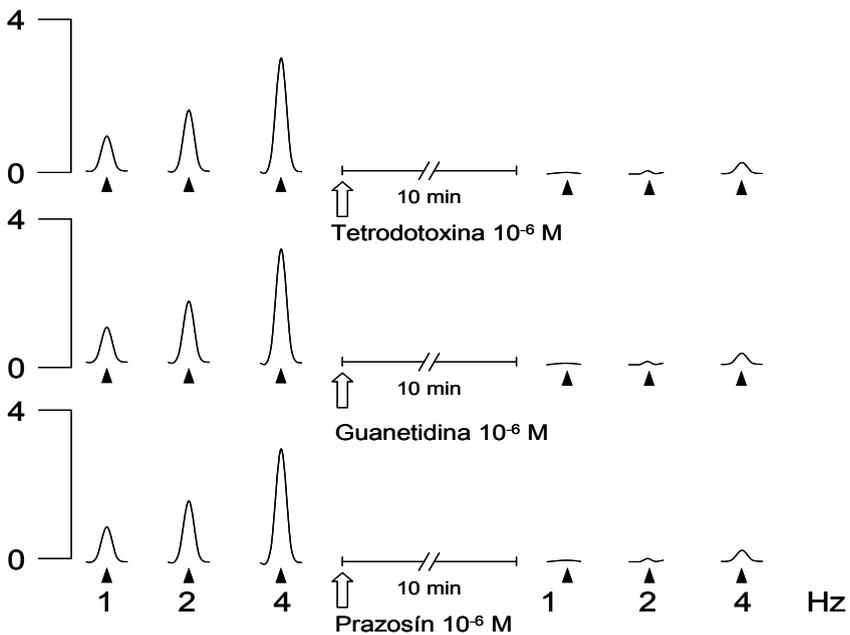


Figura 13. Ejemplo de registro de la respuesta al estímulo eléctrico perivasculares en segmentos de vena safena humana.

1. PARTICIPACIÓN DE PROSTAGLANDINAS

La indometacina (10^{-5} M) no potenció la respuesta contráctil al estímulo eléctrico en segmentos de vena safena en el rango de frecuencias estudiado (Figura 14, tabla 5). Estos resultados indican que el estímulo neurógeno no es capaz de inducir la liberación de prostaglandinas relajantes en la vena safena.

2. PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

El L-NMMA (10^{-4} M) aumentó significativamente ($p < 0.05$) la respuesta al estímulo eléctrico en segmentos de vena safena, lo que sugiere que el estímulo eléctrico es capaz de inducir la liberación de óxido nítrico, atenuando así la respuesta contráctil. (Figura 15 y tabla 5).

El bloqueo conjunto de COX y NOS con indometacina y L-NMMA, no incrementó los efectos inducidos por L-NMMA.

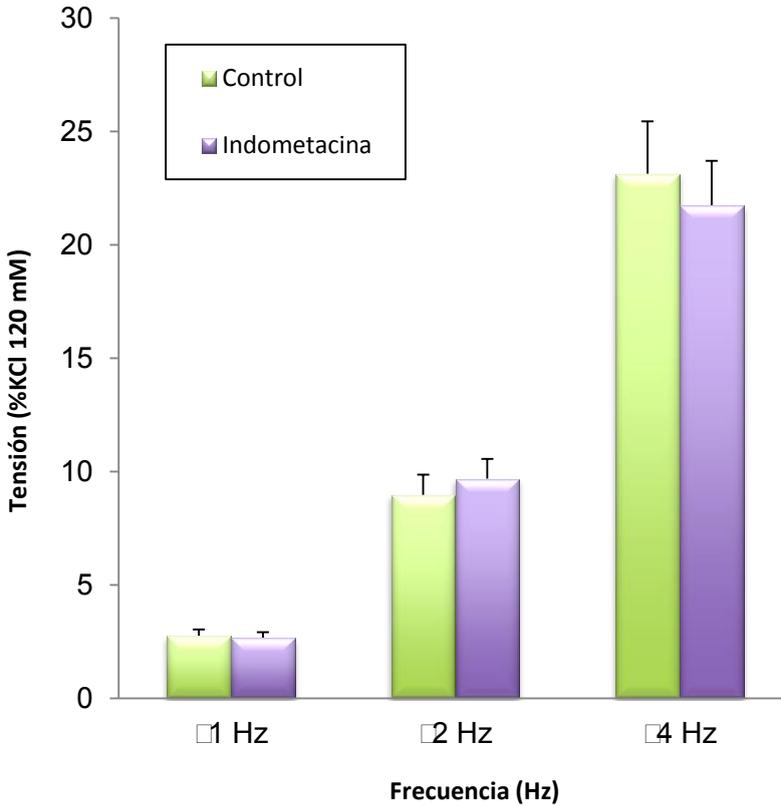


Figura 14. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en ausencia (control) y presencia de indometacina (10^{-5} M).

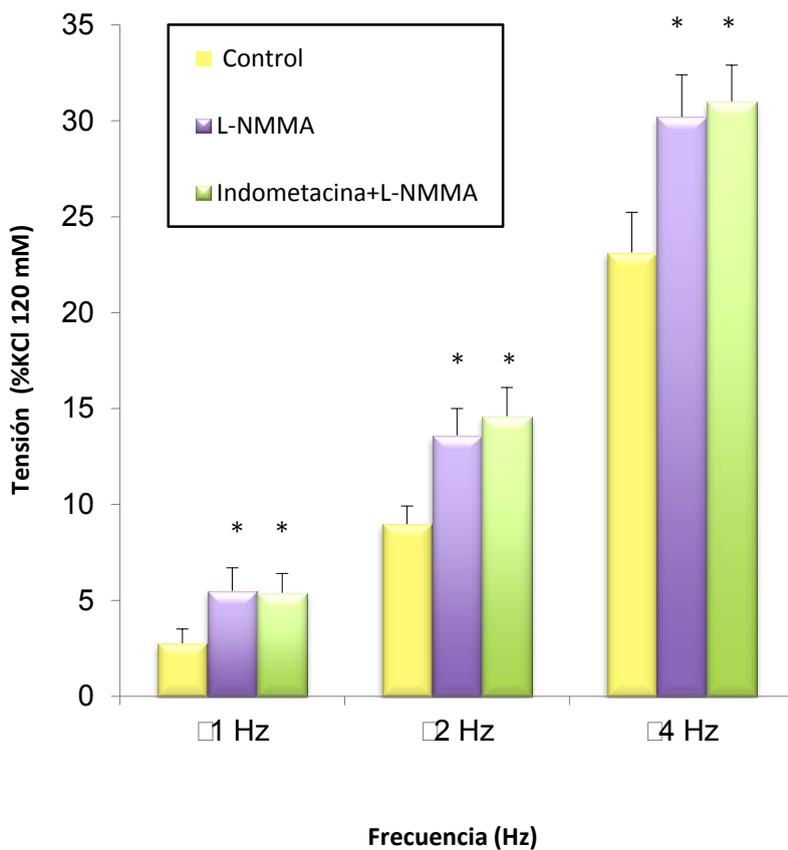


Figura 15. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en ausencia (control) y en presencia de L-NMMA (10^{-4} M) y de indometacina (10^{-5} M) con L-NMMA (10^{-4} M). * $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control.

Tabla 5. Valores de respuesta al estímulo eléctrico de vena safena humana en condiciones control y en las distintas situaciones experimentales.

Estímulo Eléctrico	1 Hz	2 Hz	4 Hz	n
Control	2,76 ± 0.75	8,97 ± 0.95	23,13 ± 2,10	18
Indometacina 10⁻⁵ M	2,68 ± 0.50	9,69 ± 1,20	21,75 ± 2,60	12
L-NMMA 10⁻⁴ M	5,50 ± 1,20*	13,60 ± 1,40*	30,20 ± 2,2*	12
Indometacina 10⁻⁵ M + +L-NMMA 10⁻⁴ M	5,4 ± 1,0*	14,6 ± 1,5*	31,0 ± 1,9*	19

* $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de pacientes.

3. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K⁺ ACTIVADOS POR CALCIO

De nuevo la situación control de las curvas frecuencia-respuesta, requiere del bloqueo previo de la COX y la NOS con indometacina y L-NMMA respectivamente.

En estas condiciones, tanto la iberiotoxina (10^{-7} M) como la charibdotoxina (10^{-7} M) potenciaron la respuesta contráctil al estímulo eléctrico (Figuras 16, tabla 6). La apamina (10^{-6} M) no modificó la respuesta al estímulo eléctrico (Figura 16, tabla 6). Estos resultados indican que hay una participación de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de alta conductancia en respuesta al estímulo neurógeno.

Tabla 6. Valores de respuesta al estímulo eléctrico en ausencia (control) y en presencia de diferentes inhibidores de canales de K^+ .

Estímulo Eléctrico	1 Hz	2 Hz	4 Hz	n
Control	5,4 ± 1,0	14,6 ± 1,5	31,0 ± 1,9	19
Iberiotoxina 10^{-7} M	8,6 ± 0,7*	24,8 ± 6,5*	52,7 ± 7,1*	8
Charibdotoxina 10^{-7} M	8,1 ± 0,7*	25,5 ± 5,4*	53,6 ± 4,9*	8
Apamina 10^{-6} M	6,7 ± 1,4	17,1 ± 3,9	34,1 ± 6,2	6
Glibenclamida 10^{-5} M	5,9 ± 0,8	21,5 ± 2,3*	46,5 ± 7,0*	10

* $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

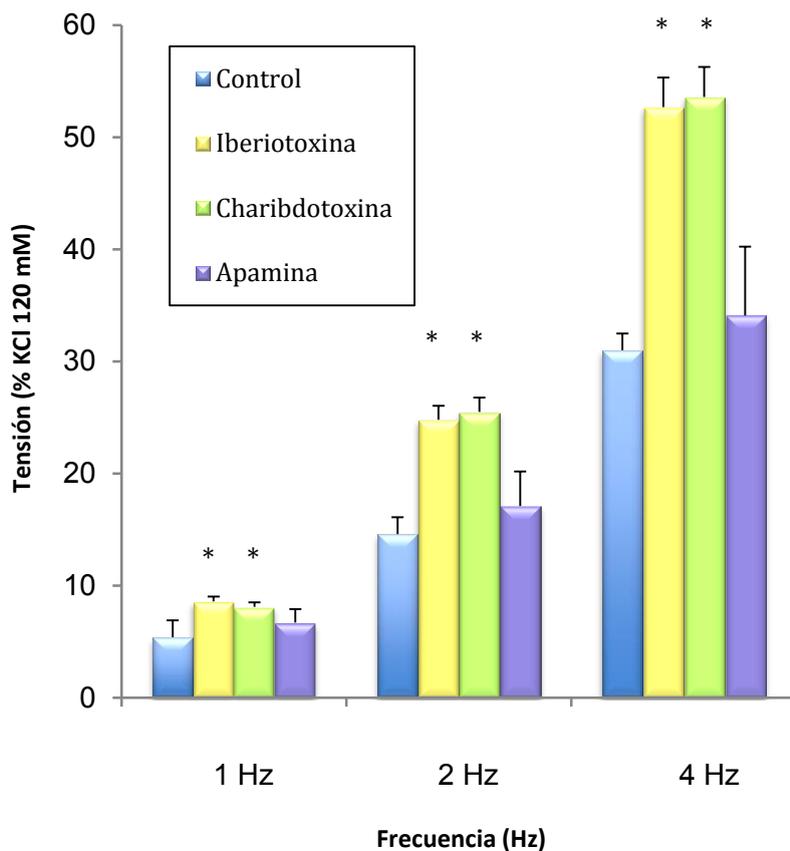


Figura 16. Efecto contráctil del estímulo eléctrico en ausencia (control) y en presencia de iberiotoxina (10^{-7} M), charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M). Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M). * $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control.

4. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K⁺ SENSIBLES A ATP

La glibenclamida potencia la respuesta contráctil inducida por el estímulo eléctrico a 2 y 4 Hz, a diferencia de lo observado para iberiotoxina o charibdotoxina, que potenciaban el estímulo eléctrico en todo el rango de frecuencias estudiado. Los resultados indican la participación de los canales de K⁺ sensibles al ATP en la respuesta adrenérgica de origen neurógeno. (Figura 17, tabla 6).

5. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K⁺ VOLTAJE DEPENDIENTES

En segmentos con bloqueo previo de la COX y la NOS con indometacina y L-NMMA, 4-aminopiridina (10^{-6} - 10^{-4} M) induce una potenciación de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico que fue dependiente de la concentración. (Figura 18 y tabla 7) Estos

resultados indican que hay una participación de los canales de K^+ voltaje dependientes en respuesta al estímulo neurógeno.

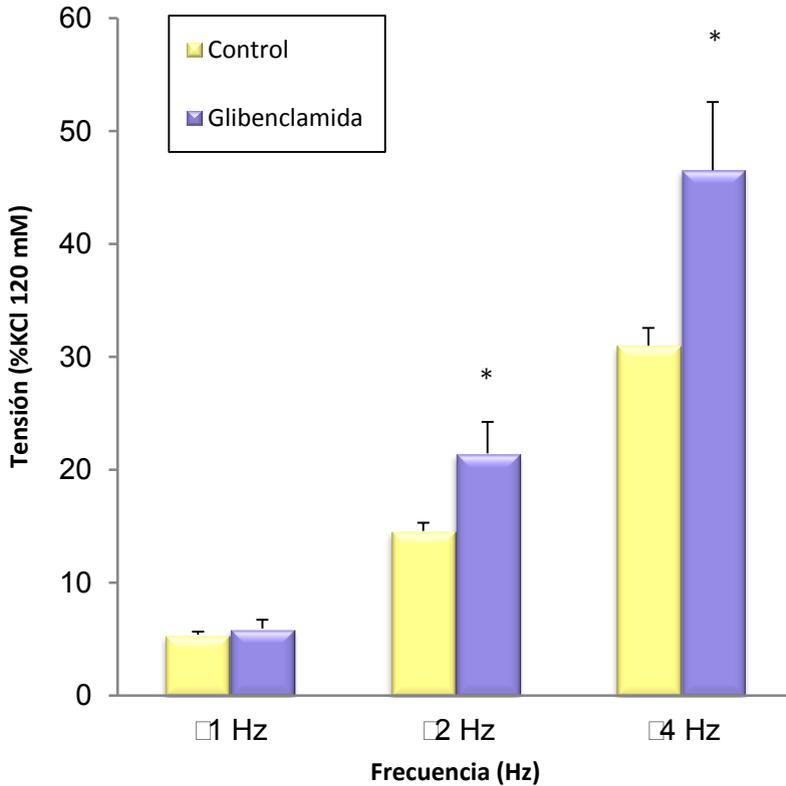


Figura 17. Efecto contráctil del estímulo eléctrico en ausencia (control) y presencia de glibenclamida ($10^{-5} M$). * $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina ($10^{-5} M$) y L-NMMA ($10^{-4} M$).

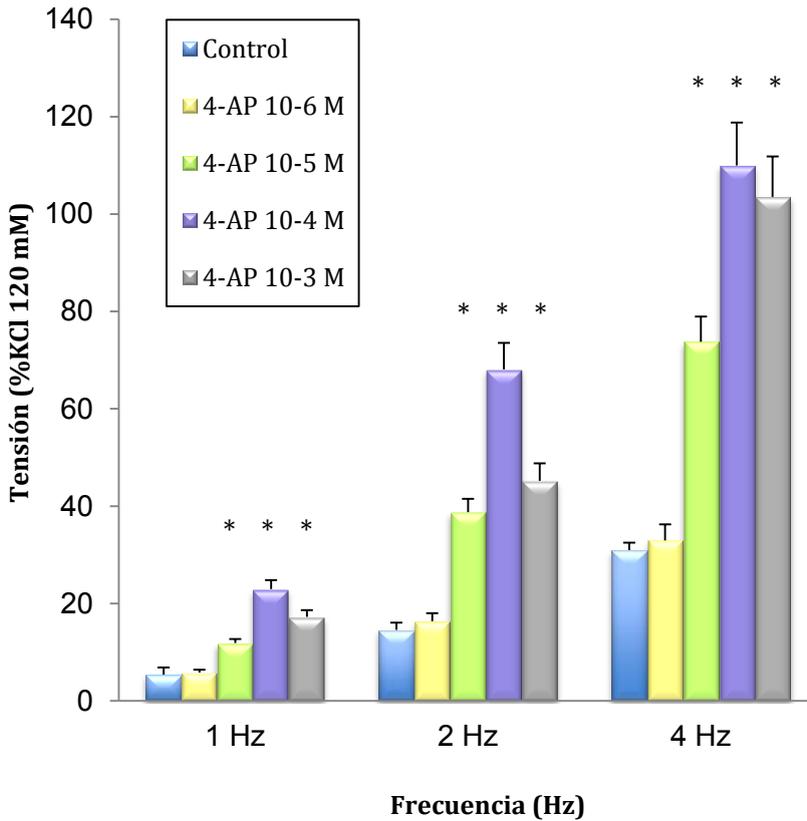


Figura 18. Efecto contráctil del estímulo eléctrico en ausencia (control) y en presencia de 4- AP a diferentes concentraciones. * $p < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 7. Valores de respuesta al estímulo eléctrico en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de 4-aminopiridina.

Estímulo Eléctrico	1 Hz	2 Hz	4 Hz	n
Control	5,4 ± 1,0	14,6 ± 1,5	31,0 ± 1,9	19
4-Aminopiridina 10 ⁻⁶ M	5,8 ± 1,0	16,4 ± 1,6	33,0 ± 2,5	8
4-Aminopiridina 10 ⁻⁵ M	11,9 ± 1,4*	38,8 ± 2,8*	73,8 ± 4,8*	10
4-Aminopiridina 10 ⁻⁴ M	23,0 ± 2,7*	68,1 ± 5,1*	110,0 ± 7,1*	9
4-Aminopiridina 10 ⁻³ M	17,3 ± 4,9*	45,2 ± 5,3*	103,5 ± 8,7*	7

* $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n = número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

En resumen, los resultados derivados del estudio con bloqueantes de los canales de K^+ indican que en la respuesta adrenérgica neurógena participan los canales de K^+ activados por Ca^{+2} de alta conductancia, los dependientes de voltaje y los dependientes de ATP. El bloqueo selectivo de estos canales produce una potenciación de la respuesta al estímulo eléctrico.

6. PAPEL DE LOS CANALES DE CALCIO

Para estudiar la naturaleza de esta potenciación incubamos con nifedipino (10^{-6} M) los segmentos en las condiciones experimentales en las que se había producido la potenciación y se registró la respuesta a la frecuencia de 2 Hz. El nifedipino no afectó significativamente a la contracción inducida por el estímulo eléctrico pero revirtió la potenciación inducida por iberiotoxina, charibdotoxina y glibenclamida (Figura 19) indicando que la potenciación es debida a la participación de los canales de Ca^{+2} tipo L.

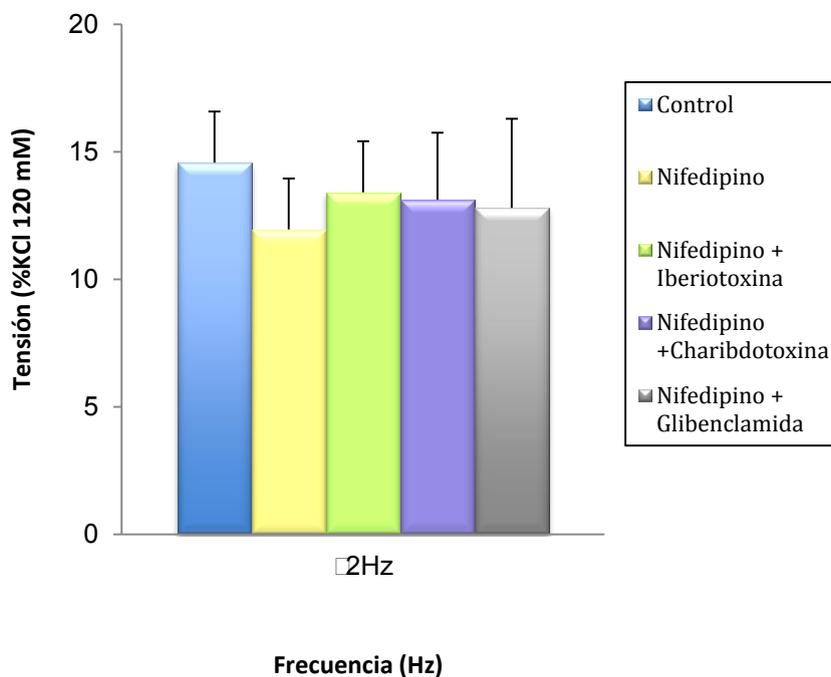


Figura 19. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico (2 Hz) en condiciones de control y en presencia de nifedipino (10^{-6} M), nifedipino (10^{-6} M) con iberiotoxina (10^{-7} M), nifedipino (10^{-6} M) con charibdotoxina (10^{-7} M) y nifedipino (10^{-6} M) con glibenclamida (10^{-5} M). Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 8. Valores de respuesta a 2 Hz de estímulo eléctrico en ausencia (control), y en presencia de nifedipino, nifedipino con iberiotoxina, nifedipino con charibdotoxina y nifedipino con glibenclamida.

Estímulo Eléctrico	2 Hz	n
Control	14,58 ± 1,98	8
Nifedipino 10 ⁻⁶ M	11,96 ± 2,02	8
Nifedipino 10 ⁻⁶ M + Iberiotoxina 10 ⁻⁷ M	13,41 ± 2,15	7
Nifedipino 10 ⁻⁶ M + Charibdotoxina 10 ⁻⁷ M	13,2 ± 2,70	7
Nifedipino 10 ⁻⁶ M + Glibenclamida 10 ⁻⁵ M	12,80 ± 3,50	7

n = número de pacientes. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10⁻⁵ M) y L-NMMA (10⁻⁴ M).

4-AP también potenció la respuesta al estímulo eléctrico, probablemente por apertura de canales de Ca⁺². Con el fin de dilucidar la naturaleza de los canales de Ca⁺² implicados, segmentos incubados con 4-aminopiridina (10⁻⁵ M) se incubaron en ausencia y en presencia de nifedipino (10⁻⁶ M, 3x10⁻⁶ M) y de distintas

conotoxinas, bloqueantes específicos de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Nifedipino bloqueó en parte la potenciación inducida por 4-aminopiridina (Figura 20 y tabla 9) lo que pone de manifiesto la participación de canales de Ca^{2+} distintos de los de tipo L. La incubación con conotoxina GVIA, bloqueante específico de los VGCC tipo N y L o con conotoxina MVIIA, bloqueante específico de los VGCC tipo N inhibe la potenciación inducida por 4-aminopiridina (Figuras 21a y 21b, tabla 9). La presencia de conotoxina MVIIC, bloqueante específico de los VGCC tipo Q o de conotoxina IVA, bloqueante específico de los VGCC P no modificó la respuesta a la 4-aminopiridina (Figuras 21c y 21d, tabla 9). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de los canales de Ca^{2+} de tipo N en la potenciación inducida por la 4-aminopiridina.

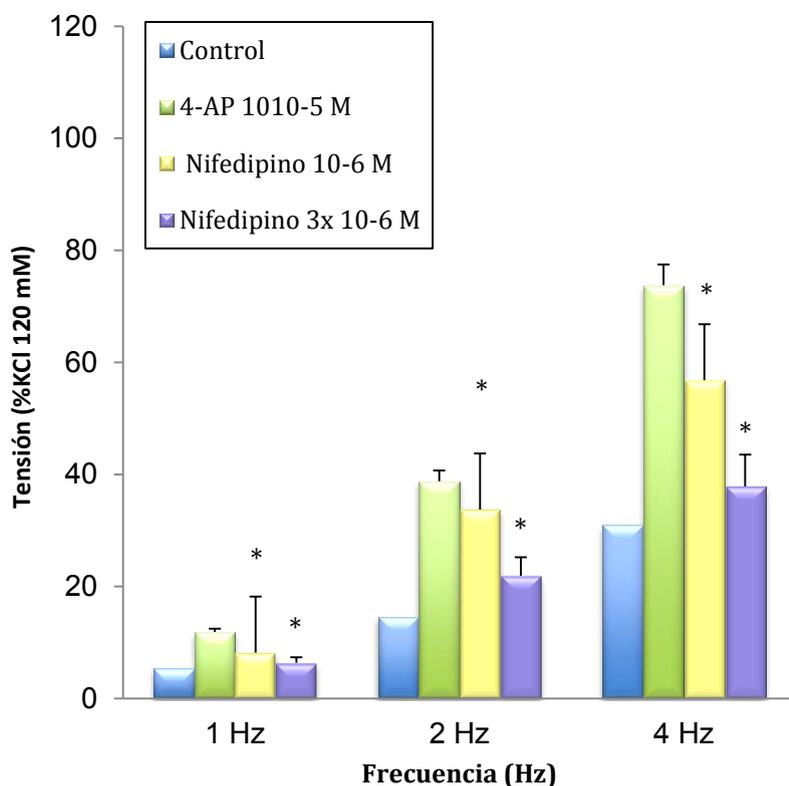
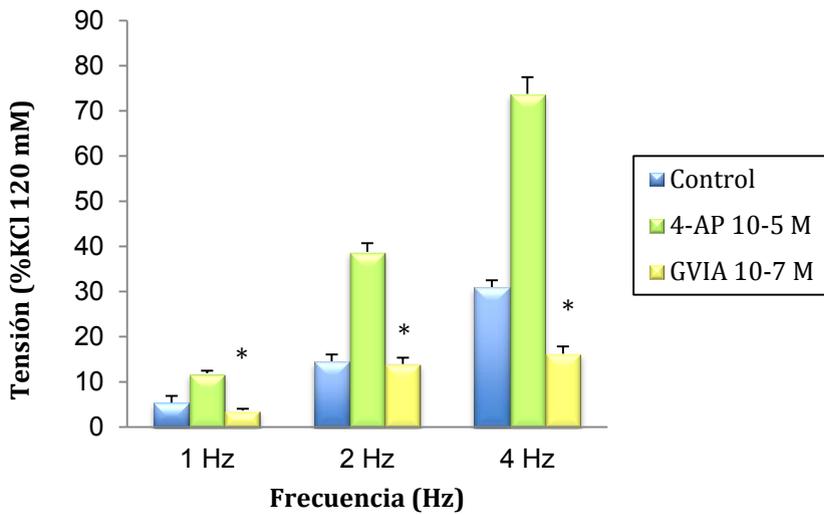
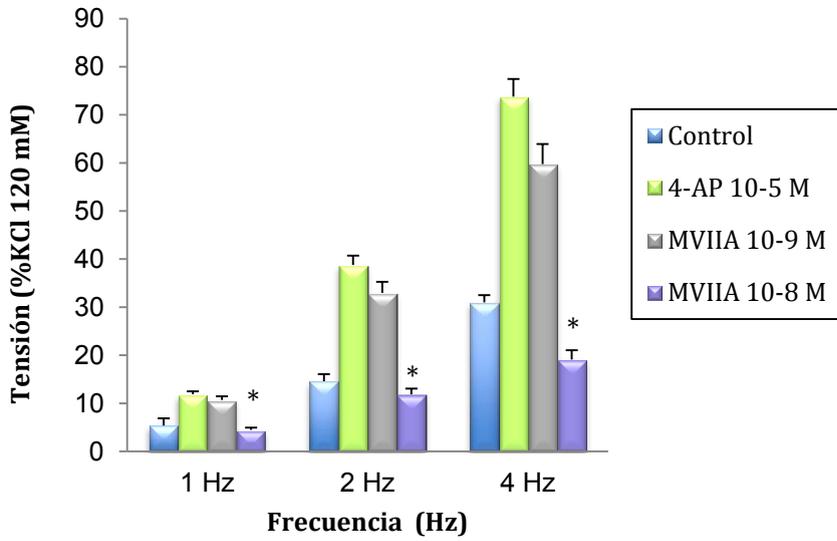
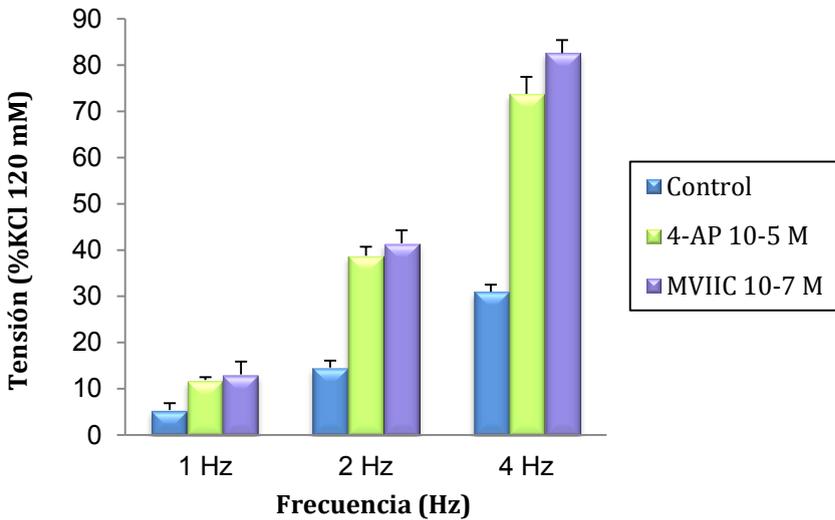
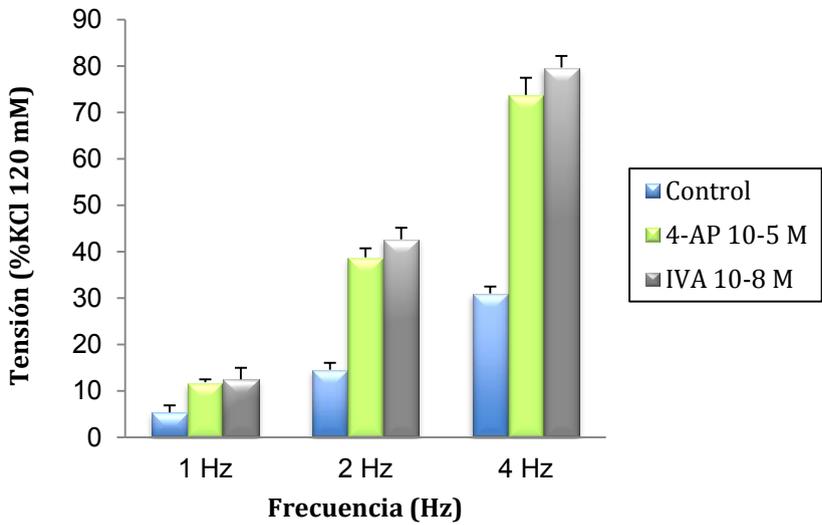


Figura 23. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en condiciones de control y en presencia de 4-AP (10^{-5} M), en presencia de 4-AP (10^{-5} M) con nifedipino a 10^{-6} M y en presencia de 4-AP (10^{-5} M) con nifedipino a 3×10^{-6} M. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M). * $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo de 4-AP.

Resultados





Figuras 21 a-d. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en condiciones de control, en presencia de 4-AP y en presencia de 4-AP (10-5 M) con diferentes conotoxinas. Todos los experimentos se realizaron previa incubación con indometacina (10-5 M) y L-NMMA

(10-4M). *P<0,05 con respecto a los valores del grupo de 4-AP.

Tabla 9. Valores de respuesta al estímulo eléctrico con 4- aminopiridina en ausencia y en presencia de diferentes bloqueantes.

Estímulo Eléctrico	1Hz	2Hz	4Hz	n
4-AP 10 ⁻⁵ M	11,9 ± 1,4	38,8 ± 2,8	73,8 ± 4,8	10
4-AP 10 ⁻⁵ M + Nifedipino 10 ⁻⁶ M	8,2 ± 1,5*	33,7 ± 4,2*	56,8 ± 6,0*	8
4-AP 10 ⁻⁵ M + Nifedipino 3 x 10 ⁻⁶ M	6,4 ± 1,1*	21,9 ± 3,4*	37,9 ± 4,2*	7
4-AP 10 ⁻⁵ M + GVIA 10 ⁻⁷ M	3,7 ± 0,5*	14,0 ± 1,6*	16,2 ± 1,7*	6
4-AP 10 ⁻⁵ M + MVIIA 10 ⁻⁹ M	10,7 ± 0,6	33,0 ± 2,7	59,8 ± 5,6	6
4-AP 10 ⁻⁵ M + MVIIA 10 ⁻⁸ M	4,5 ± 0,8*	11,9 ± 1,2*	19,1 ± 1,9*	7
4-AP 10 ⁻⁵ M + IVA 10 ⁻⁹ M	12,5 ± 1,8	42,7 ± 2,5	79,7 ± 3,1	7
4-AP 10 ⁻⁵ M + MVIIC 10 ⁻⁷ M	13,1 ± 2,6	41,5 ± 2,7	82,6 ± 3,0	6

*p<0,05 con respecto a los valores del grupo 4- AP. n= número de pacientes.

DISCUSIÓN

Al plantear esta tesis, tan alejada en términos metodológicos de la práctica quirúrgica, nos encontrábamos con el problema de su aplicación directa a la clínica, olvidándonos así, de que se trata de una investigación básica, que aún tiene que madurar para poder llegar al paciente con garantías. El presente trabajo estudia a nivel del vaso sanguíneo, los mecanismos que regulan su reactividad, con la pretensión de ahondar en los conocimientos fisiológicos más básicos para aumentar nuestro entendimiento sobre la función vascular y poder aplicarlos en un futuro a la práctica clínica.

Sabemos que la respuesta vascular a un agonista adrenérgico es, en la mayoría de territorios vasculares, una contracción del músculo liso. Sin embargo, una serie de mecanismos se activan desde la unión del agonista al receptor hasta la contracción final, que son los responsables de que ese efecto sea posible. Muchas veces dichos mecanismos son modulados por el

endotelio, que puede verse alterado en algunas patologías, por lo que éstas pueden cambiar la respuesta a ciertos agonistas.

Además estos mecanismos que subyacen no son siempre los mismos en cualquier territorio vascular, por lo que tampoco son igual de idóneos los diversos candidatos a ser utilizados como injertos en un bypass aorto-coronario. Nosotros nos hemos centrado en estudiar la vena safena, por ser la más comúnmente utilizada en la última década en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia, del cual procede el material para realizar esta tesis doctoral. Los hallazgos encontrados suponen un mejor entendimiento de la reactividad vascular de este injerto y pueden diferir de los encontrados en arteria mamaria, radial u otros injertos utilizados junto con la vena safena para el mismo fin.

El objetivo general es conocer el grado de implicación del endotelio en la modulación de la respuesta adrenérgica

vasoconstrictora de la vena safena humana. Para ello, diseñamos los objetivos específicos, consistentes en estudiar la participación en la respuesta adrenérgica exógena y neurógena, de cada uno de los factores endoteliales por separado, con especial énfasis en la participación de canales de potasio.

A diferencia de otras especies, en el ser humano hay pocos estudios donde se valore la respuesta vascular al estímulo adrenérgico y la participación de factores endoteliales, sobre todo los relacionados con canales iónicos donde se han descrito discrepancias en el tipo y función de los canales dependiendo del lecho vascular y de la especie^{103, 66}.

En este sentido, el presente trabajo se realiza con el fin de aportar conocimientos sobre los mecanismos que intervienen en la respuesta adrenérgica, valorando sobre todo la participación de canales iónicos. El mayor entendimiento de estos mecanismos en

vasos utilizados en la revascularización coronaria, puede contribuir al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Procedencia de los segmentos venosos

El procedimiento que hemos utilizado permite el estudio *in vitro* de segmentos venosos sin riesgos ni actuaciones técnicas adicionales que puedan perjudicar al paciente. La extracción de los segmentos venosos se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Cada vez hay más evidencias de que la función de los canales iónicos está alterada en la mayor parte de las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial (HTA), diabetes y aterosclerosis ^{79, 104-113}. No sabemos si esta alteración es causa o

efecto de la enfermedad y tampoco si se trata de un cambio en el número de canales o en su conductancia

La HTA, por ejemplo, parece aumentar la función de los BK_{ca} ^{104, 105}, quizá como un mecanismo que limite la vasoconstricción inducida por el aumento de la presión, mayor depolarización de la membrana que produce menor actividad de los canales K_V ^{106, 114}. La diabetes produce descenso funcional de los K_{ATP} ^{107, 108, 109} en aorta y arteria mesentérica aislada de rata y un ascenso en los estadios precoces que reflejan el alto estado metabólico (bajos niveles ATP)¹¹⁰. La hipercolesterolemia disminuye el NO y aumenta el tono vascular basal¹¹¹ con un incremento compensatorio de la función de canales BK_{ca} ^{112, 113}.

Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

Antes de empezar a discutir los resultados, no hay que olvidar que la técnica utilizada en la presente tesis doctoral tiene ventajas y limitaciones como cualquier procedimiento experimental *in vitro*, por tanto, debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*. En el vaso aislado falta la regulación neurohormonal presente en el individuo sano o enfermo. Además, los mecanismos de adaptación que pueden aparecer en el enfermo sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones circunscritas en el órgano efector que es la propia pared vascular. Precisamente la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares en los estudios clínicos constituye una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano efector.

Concretamente, en la vena safena humana, algunos autores describen cambios muy precoces en el endotelio venoso tras arterialización del flujo ^{115, 116}. Cuando se transfiere una vena al circuito arterial se expone a nuevas fuerzas, incluyendo shear stress, deformación circunferencial y pulsatilidad del flujo. La apertura de canales iónicos es la primera respuesta a estos cambios hemodinámicos y ocurre en milisegundos. Parece ser que los canales BK_{ca} y K_v son los más dependientes de la presión intraluminal ¹¹⁵ siendo activos únicamente a partir de determinados valores de presión y son parte del mecanismo de adaptación a largo plazo a las altas presiones. También se inducen importantes cambios de forma precoz (ya cuantificables a los 90 minutos) en la adhesión leucocitaria, moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y eNOS ¹¹⁶. Nuestro estudio se realiza en vena recién extraída del paciente con flujo no arterial por lo que los resultados deben ser extrapolados con precaución.

Las características demográficas y factores de riesgo son los esperados en una población subsidiaria de cirugía de revascularización coronaria. Nuestros resultados proceden de pacientes con patología cardiovascular y por tanto pueden presentar alteraciones en los canales iónicos.

RESPUESTA A LA NORADRENALINA Y AL ESTÍMULO ELÉCTRICO

La noradrenalina produce contracción dependiente de la concentración en segmentos de vena safena humana a través de la activación de receptores α -adrenérgicos en el musculo liso vascular. Los mecanismos implicados son la liberación de Ca^{2+} intracelular por la vía del inositol trifosfato ¹¹⁷ y la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales receptor dependientes sensibles a las dihidropiridinas ¹¹⁸. De igual forma, la vena safena contrae en

respuesta al estímulo eléctrico de forma frecuencia-dependiente. La respuesta contráctil al estímulo eléctrico (2 Hz) es aproximadamente el 10% de la respuesta máxima al KCl. Es una respuesta menor que la que se obtiene en arterias pulmonares ($20 \pm 4\%$) y similar a la de arterias mesentéricas ($8 \pm 2\%$) y deferente ($10 \pm 3\%$) humanas obtenidas por cirugía^{37, 38, 101}. Puesto que la contracción es abolida por tetrodotoxina, un bloqueante de los canales de sodio neuronales; guanetidina un bloqueante de la liberación de noradrenalina y prazosin, un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos, esta respuesta es debida a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares que ejerce su acción sobre receptores α_1 adrenérgicos localizados en el músculo liso vascular. En base a los resultados se deduce que la vena safena tiene una marcada respuesta contráctil al estímulo adrenérgico y por tanto puede modificar la resistencia cuando aumenta la actividad simpática o aumentan los niveles de catecolaminas.

La modulación endotelial a estímulos vasoconstrictores se ha atribuido a la liberación de sustancias relajantes por parte de las células endoteliales que se oponen al efecto contráctil sobre el músculo liso. En este sentido, el endotelio es capaz de liberar prostaglandinas relajantes (PGI₂), óxido nítrico y factor hiperpolarizante (EDHF), tres sustancias que pueden modificar la respuesta vascular de la vena safena humana.

1. PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS

La prostaglandina relajante PGI₂ es un metabolito del ácido araquidónico en cuya síntesis interviene la ciclooxigenasa que activa los receptores de inositol trifosfato del músculo liso vascular incrementando los niveles de AMPc y produciendo relajación.

El bloqueo de la síntesis de prostaglandinas con indometacina no modifica la respuesta adrenérgica (exógena y neurógena) en la vena safena humana, lo cual sugiere que no hay

una liberación efectiva de sustancias prostanoides. Sin embargo, en aorta de rata ^{119, 120} y en vena cefálica humana¹²¹ o en la arteria gastroepiploica humana¹²² se ha demostrado su participación. Es posible que las diferencias existentes entre vena safena humana y estos vasos, aparte del territorio vascular y la especie, radiquen en la diferencia de calibre de los vasos y la perfusión de todo el lecho vascular.

2. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es una de las sustancias vasodilatadoras de origen endotelial que hay que tener presente como sustancia relajante ¹²³⁻¹²⁵. El óxido nítrico induce relajación por un mecanismo que activa la guanilato ciclasa, incrementando el GMP cíclico ⁴³. La formación de óxido nítrico a partir de la L-arginina se bloquea en presencia de inhibidores del enzima óxido nítrico sintasa como el L-NMMA ⁴². En nuestros resultados se demuestra

que la adición de L-NMMA produce un incremento significativo de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico y a la noradrenalina en venas con endotelio indicando que el óxido nítrico liberado de las células es el responsable de la disminución de la respuesta contráctil inducida por el estímulo eléctrico y por la noradrenalina. En el mismo sentido, se ha demostrado la participación de NO en respuesta a la noradrenalina en segmentos de vena cefálica humana¹²⁶, arteria tiroidea humana¹²⁷ o arterias mesentéricas de rata¹²⁸ y confirman resultados previos en la propia vena safena humana¹²⁹. En otros vasos el bloqueo de la NOS incrementa la respuesta al estímulo eléctrico sin modificar la respuesta a la noradrenalina¹³⁰. Durante el estímulo nervioso se liberan otros neurotransmisores que podrían ser responsables de inducir la producción de sustancias relajantes, fundamentalmente NO, o liberarlo de las terminaciones no adrenérgicas no colinérgicas o nitrérgicas. El término no adrenérgico no colinérgico utilizado para hacer referencia a algunas neuronas parasimpáticas que liberan péptidos como la sustancia P o el NO en el tracto gastrointestinal¹³¹, también aparece en los vasos sanguíneos¹³². Diversos grupos de investigación han puesto de manifiesto la relajación dependiente de

NO en arterias peneanas humanas, en respuesta al estímulo eléctrico y a agonistas relajantes cuyo mecanismo de acción implica la liberación de NO endotelial^{133, 134}.

Nuestros resultados indican que tanto la noradrenalina como el estímulo eléctrico produce liberación de NO que atenua la contracción en la vena safena humana.

Parece ser que la capacidad para producir NO varía dependiendo del lecho vascular, así los grandes vasos sanguíneos como la aorta son también grandes productores de NO, mientras que los vasos de pequeño calibre muestran menos capacidad de producir NO y más capacidad de síntesis de factor hiperpolarizante¹³⁵. En relación con los injertos usados en el bypass aorto-coronario, está demostrado que la vena safena tiene menos capacidad de producir NO que la arteria mamaria interna^{130, 136}.

3. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K^+ ACTIVADOS POR CALCIO (K_{CA})

El tercer factor relajante dependiente del endotelio es el EDHF. Aunque no se conoce con exactitud su naturaleza y mecanismo de acción, se sabe que la vasodilatación se produce por hiperpolarización del musculo liso vascular mediante apertura de canales de potasio. La salida de iones potasio del endotelio a través de estos canales, provocaría un aumento de su concentración en el espacio mioendotelial, esto activaría la bomba Na^+-K^+ en la célula muscular provocando hiperpolarización, que llevaría a la relajación muscular ⁶⁴. Inversamente, el bloqueo de canales de K^+ produciría despolarización, apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y vasoconstricción ^{70,69}. La combinación de charibdotoxina y apamina, bloquea por completo los canales K_{Ca} en arterias de rata lo cual pone de manifiesto su participación en la hiperpolarización

⁶⁴.

En nuestro estudio en vena safena humana, la charibdotoxina e iberiotoxina, bloqueantes de los canales de K_{Ca} de alta e intermedia conductancia y de alta conductancia respectivamente, potencia la respuesta a la noradrenalina y al estímulo eléctrico mientras que apamina, bloqueante de los canales de K_{Ca} de baja conductancia, no modifica la respuesta inducida por noradrenalina o estímulo eléctrico. Estos resultados descartan la participación de canales de baja conductancia en la respuesta adrenérgica. Parece ser que estos canales tienen importancia en la hiperpolarización de vasos de menor calibre ⁶⁴ que la vena safena. De hecho, en venas humanas de calibre más o menos similar a la safena, también se ha descartado la participación de los canales K_{Ca} de baja conductancia en respuesta a la noradrenalina ¹²⁶.

Aunque no se puede descartar la participación de canales K_{Ca} de intermedia conductancia, el hecho de que charibdotoxina e iberiotoxina produzcan un efecto similar, puede indicar la baja o

nula participación de los canales K_{Ca} de intermedia conductancia. Por otra parte, puesto que la charibdotoxina también tiene efecto sobre algunos canales de potasio voltaje dependientes¹³⁷, tampoco se puede descartar su participación. Puesto que iberiotoxina y charibdotoxina incrementan la contracción inducida por el estímulo eléctrico y noradrenalina, sugiere que los canales K_{Ca} modulan la acción del neurotransmisor en el musculo liso y sin modificar la liberación de neurotransmisor. En vena renal y cefálica humanas⁴⁷,¹³⁸ así como en arteria tiroidea humana¹²⁷,¹³⁸ también se ha demostrado la participación de estos canales K_{Ca} en la respuesta a estímulos relajantes como la acetilcolina.

Los bloqueantes de los canales de K_{Ca} no poseen efectos sobre los segmentos venosos sometidos a tensión basal. Estos resultados en vena safena humana confirman estudios previos en el territorio arteriolar del hámster donde se ha comprobado que los canales de K_{Ca} no estaban activos a tensión basal pero podían ser activados durante vasoconstricción¹⁰³. En resumen la activación de

los canales de K_{Ca} de alta conductancia produce un feedback negativo en la regulación del tono muscular liso durante la estimulación adrenérgica.

En el mecanismo de acción del EDHF se ha demostrado la participación de canales de potasio (ATP dependientes o rectificadores^{67, 70, 72}) además de los K_{Ca} . Por otra parte, la técnica experimental utilizada en la presente tesis doctoral permite medir la relajación del músculo liso vascular, pero no la hiperpolarización, aunque esta última acabe traducándose en relajación. Por estos motivos hay que ser cautelosos al interpretar los resultados y no podemos asumir que el bloqueo de los canales K_{Ca} implique el bloqueo del EDHF, aunque sí que parece estar relacionado.

Nuestros resultados muestran que la noradrenalina produce una respuesta contráctil en la vena safena humana que es atenuada por la liberación de NO y por la activación de canales de K_{Ca} de alta conductancia. Ambos factores parecen ser los más importantes

a la hora de regular el tono vascular controlando el exceso de vasoconstricción. La importancia del NO y EDHF se ha puesto de manifiesto especialmente en aquellos experimentos que estudian la relajación endotelio-dependiente ¹³⁹. En diversas patologías que cursan con alteraciones cardiovasculares, se ha demostrado la presencia de disfunción endotelial, manifestada como una menor relajación a la acetilcolina ¹⁴⁰. Aunque la disfunción endotelial se asocia al déficit de NO, también puede deberse al déficit de otros factores como el EDHF, por lo que debería ser tratada como una alteración multifactorial ¹⁴¹. En ocasiones aumenta la producción de EDHF para paliar alteraciones de la vía de síntesis de NO¹⁴².

Cabe esperar que la contracción inducida por noradrenalina produzca la apertura de canales de K_{Ca} . Tras su bloqueo, se retrasaría la hiperpolarización, aumentaría el Ca^{2+} intracelular y como consecuencia aumentaría la respuesta contráctil inducida por noradrenalina. Estos efectos muy probablemente se deban a un aumento en el calcio intracelular y al incremento de la duración de

la despolarización de la membrana^{70, 143, 144}. En nuestro estudio la adición de nifedipino, un bloqueante de los canales de calcio tipo L, disminuyó significativamente la potenciación inducida por los bloqueantes de K_{Ca} , iberiotoxina y charibdotoxina. Esto indica que el flujo de calcio a través de los canales dihidropiridina sensibles se incrementó tras el bloqueo de los K_{Ca} . Por consiguiente el estímulo de canales de K_{Ca} de gran conductancia puede limitar la contracción del músculo liso en respuesta a la estimulación adrenérgica. Así pues, una disfunción de estos canales de potasio podría conducir al vasoespasmo o a la reducción de la capacidad de dilatación de la vena safena.

4. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K^+ SENSIBLES A ATP

Se ha utilizado la glibenclamida para estudiar la participación de los canales K_{ATP} . La concentración de inhibidor

utilizada en estos experimentos (10^{-5} M) se ha demostrado que es altamente selectiva para los canales K_{ATP} vasculares y neuronales¹⁴⁵. A concentraciones mayores ($>10^{-5}$ M) la glibenclamida puede modular otros canales iónicos y la liberación del calcio del retículo sarcoplásmico^{146, 147}.

En nuestros experimentos la glibenclamida no modificó la curva concentración-respuesta a la noradrenalina. Sin embargo, la incubación con glibenclamida sí que produjo potenciación de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico. Estos resultados indican la participación de canales de K^+ sensibles a ATP localizados a nivel presináptico pero no en el músculo liso vascular. La activación de estos canales en la respuesta adrenérgica simpática atenúa la respuesta contráctil de la vena safena. La liberación de neurotransmisor inducida por el estímulo eléctrico activaría los canales K_{ATP} presinápticos que repolarizan la membrana, el cierre de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes disminuyendo la liberación de neurotransmisor.

En esta línea, trabajos en cobaya y aurícula derecha aislada humana ¹⁴⁸ muestran que la glibenclamida modula la liberación de neurotransmisor ¹⁴⁹ aunque a concentraciones mayores. La diferente sensibilidad a la glibenclamida en los distintos tejidos y especies podría deberse a los distintos subtipos de canales K_{ATP} ¹⁵⁰ con diferentes subunidades moleculares ^{146, 151}. La adición de nifedipino disminuye significativamente la potenciación inducida por glibenclamida, indicando que la potenciación es debida a la entrada de Ca^{2+} a través de canales voltaje-dependientes de tipo L.

La glibenclamida es un antidiabético oral ampliamente usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 que pertenece al grupo de las sulfonilureas y bloquea los canales K_{ATP} . Un alto porcentaje de pacientes subsidiarios de cirugía coronaria presentan diabetes tipo 2. Nuestros hallazgos muestran que estos medicamentos podrían potenciar la respuesta adrenérgica y producir vasoespasmos en el injerto venoso. Por el contrario, fármacos que estimulen la apertura de estos canales probablemente

reduzcan los espasmos en los injertos de vena safena humana producidos por el estímulo adrenérgico.

5. PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K^+ VOLTAJE DEPENDIENTES

El musculo liso vascular expresa varios tipos de canales de K^+ incluyendo los dependientes de voltaje (K_v). La incubación con 4-AP, bloqueante de los canales K_v , potencia la respuesta contráctil inducida por el estímulo eléctrico sin modificar la respuesta a la noradrenalina. Estos resultados indican que la noradrenalina liberada en las terminaciones nerviosas activa canales de K_v localizados a nivel presináptico y no en el músculo liso vascular en la vena safena humana. La activación de estos canales contribuye al retorno a la polaridad inicial y puede limitar la contracción del musculo liso venoso en respuesta a la estimulación adrenérgica.

Similares resultados indican que 4-AP inhibe canales de K_v presinápticos localizados en las terminaciones nerviosas periféricas estimulando la liberación de noradrenalina ^{152, 153}. La liberación del neurotransmisor por exocitosis es dependiente de Ca^{2+} . Cuando un impulso nervioso llega a la neurona presináptica, se abren los canales de Ca^{2+} cuya entrada produce liberación de neurotransmisor en el espacio sináptico. Por tanto, la inhibición de los canales de K_v presinápticos con 4-AP favorece la entrada de Ca^{2+} y la liberación de más neurotransmisor incrementando la respuesta. En presencia de nifedipino, bloqueante de canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas, se revierte parcialmente la potenciación inducida por 4-AP. En presencia de las conotoxinas GVIA y MVIIA (bloqueantes selectivos de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo N y L) se bloquean los efectos potenciadores de la 4-AP. Sin embargo, MVIIC o IVA, inhibidores específicos de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes

de tipo Q y de tipo P respectivamente, no modifican la respuesta contráctil adrenérgica en la vena safena humana.

En conjunto estos resultados indican que la potenciación inducida por la 4-AP es debida a la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo N y L.

En resumen, la activación de canales de K_v puede atenuar la contracción inducida por el estímulo eléctrico en la vena safena humana. Este proceso es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo N y L. Aunque la bibliografía es escasa con respecto a la actividad de estos canales en la vena safena humana o en otro injerto vascular usado en el bypass aortocoronario, existen estudios que apuntan que estos canales contribuyen de forma significativa a controlar la secreción de neurotransmisores ⁹⁶. Las patologías que impliquen alteraciones en estos canales de K_v o modificaciones farmacológicas en la situación de apertura o cierre de canales de

Ca²⁺ voltaje-dependientes de tipo N y L pueden provocar espasmos en la vena safena o prevenir su contracción ante el estímulo adrenérgico endógeno.

CONCLUSIONES

1. La respuesta contráctil de la vena safena humana a la noradrenalina tanto endógena como exógena, es atenuada por la liberación de NO y la salida de potasio a través de canales sensibles a iberiotoxina y charibdotoxina.

2. La liberación endógena de noradrenalina, representada a través de la estimulación eléctrica, pone de manifiesto también, la participación de canales de potasio sensibles a ATP y voltaje dependientes, que atenuarían la respuesta contráctil al estímulo eléctrico.

3. La potenciación de la respuesta contráctil a la noradrenalina y al estímulo eléctrico inducida por iberiotoxina, charibdotoxina y glibenclamida, se revirtió con la administración de nifedipino, lo que indica que en esta potenciación se da la entrada de calcio a través de los canales de calcio de tipo L.

4. La potenciación de la respuesta al estímulo eléctrico obtenida con la incubación de 4-aminopiridina, revirtió parcialmente con nifedipino y totalmente con la administración de las conotoxinas GVIA y MVIIA. Esto indica que los canales involucrados en dicha potenciación son canales de calcio tipo L y canales de calcio dependientes de voltaje tipo N.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kolesov. OAVI. A pioneer of coronary revascularization by internal mammary-coronary artery grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;96:13-18
2. IE. K. The last word on “a proper name for the internal mammary artery”? *Ann Thorac Surg* 1999;68:1440-1441
3. VI K. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967;54:535-544
4. Green GE SS, Reppert EH. . Coronary arterial bypass grafts. *ann thorac surg*1968 May;5(5):443-50. 1968 May;5(5):443-50
5. Fitzgibbon GM LA, Keon WJ, Hooper GD, Burton Jr. . Coronary bypass graft fate and patient outcome. Angiographic follow-up of 5065 grafts related to survival and reoperation in 1388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol.* 1996;1996 sep 3:616-626
6. Raingo J RA, Grassi de Gende AO Ph effects on high conductance ca-activated k channels (bkca) in human internal mammary artery smooth muscle cells. *Life Sci.* 2005;77:1993-2003
7. He GW YC, Starr A. Overview of the nature of vasoconstriction in arterial grafts for coronary operations. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:676-689

8. Liu MH SFH, Furnary AP. Effects of potassium channel opener aprikalim on the receptor mediated vasoconstriction in the human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:636-641
9. Firmin LK BP, Allen P, . Sympathoadrenal function during cardiac operation in infants with the technique of surface cooling, limited cardiopulmonary bypass, and circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;90:729-735
10. Dashwood MR LA. The saphenous vein as a bypass conduit: The potential role of vascular nerves in graft performance. *Curr Vasc Pharmacol.* . 2009;7:47-57
11. Deja MA GK, Malinowski M, Woś S, Kolowca M, Biernat J, Kajor M, Spyt TJ . Skeletonization of internal thoracic artery affects its innervation and reactivity. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;28:551-557
12. Racchi H IM, Howard M, Morán S, Zalaquett R, Huidobro-Toro JP. . Adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide y are co-transmitters in conjunction with noradrenaline in the human saphenous vein. *Br J Pharmacol.* . 1999;126:1175-1185
13. Novakovic A G-BL, Cokic-Beleslin B, Zigon-Japundzic N, Sajic Z et al. Differential antivasoconstrictor effects of levromakalim and rilmakalim on the isolated human internal mammary artery and saphenous vein. *J Pharmacol Sci.* 2003;92:108-114

14. Donoso M.V. MR. Neuropeptide y is released from human mammary and radial vascular biopsies and is a functional modulator of sympathetic cotransmission. *J Vasc Res* 2004;41:387–399
15. Polonen P RE, Hippelainen M, Poyhonen M, Takala J. A prospective, randomized study of goal-oriented hemodynamic therapy in cardiac surgical patients. *Anesth Analg* 2000;90:1052-1059.
16. Doyle AR DA, Moors AH, Latimer RD. . Treatment of perioperative low cardiac output syndrome. *Ann Thorac Surg* 1995;59:3-11
17. Bastien O, Vallet B. French multicentre survey on the use of inotropes after cardiac surgery. *Crit Care* 2005;9:241-242
18. Royster RL, Butterworth JFt, Prough DS, Johnston WE, Thomas JL, PE H. Preoperative and intraoperative predictors of inotropic support and longterm outcome in patients having coronary artery bypass grafting. *Anesth Analg* 1991;72:729-736
19. Butterworth JF, Legault C, Royster RL, Hammon JWJ. Factors that predict the use of positive inotropic drug support after cardiac valve surgery. *Anesth Analg* 1998; 86:461-467
20. Chesebro JH FV, Elveback LR, et al Effect of dipyridamole and aspirin on late vein-graft patency after coronary bypass operations. *N Engl J Med* 1984

21. Goldman S CJ, Moritz T. Long-term graft patency (3 years) after coronary artery surgery. Effects of aspirin: Results of a va cooperative study. *Circulation* 1994
22. Group M Dat M So PIR. Aspirin and mortality from coronary bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002
23. Anonymous. The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts. The post coronary artery bypass graft trial investigators. *N Engl J Med* 1997
24. Frick MH SM, Nieminen MS, et al. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of hdl cholesterol. Lipid coronary angiography trial (locat) study group. *Circulation* 1997
25. Mann MJ WA, Donaldson MC, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with e2f decoy: The prevent single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 1. 1997
26. Mann MJ CM. Transcription factor decoys for the prevention of vein bypass graft failure. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003
27. Moncada S HA. The l-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993:2002-2012.

28. Vane JR ÅE, Botting RM. . Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990:27-36
29. Luscher. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990:482-485.
30. Best LC, Holland TK, Jones PB, Russell RG. The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro. *Thromb Haemost* 1980:38-40
31. Ambler J, Birch J, Maguire ED, Wallis RB. Role of thromboxane a₂. *Adv Exp Med Biol* 1985:293-308
32. Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in swiss 3t3 fibroblasts: Evidence for g protein regulation of phospholipase a₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987:6374-6378
33. Hamberg M SJ, Wakabayashi T, Samuelsson B. . Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974:345-349
34. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376
35. Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther*. 1989;41:303-352

36. Vila JM, Martin de Aguilera E, Martinez Cuesta MA, Martinez MC, Irurzun A, Lluch S. Endothelium attenuates contractile responses of goat saphenous arteries to adrenergic nerve stimulation. *Comp Biochem Physiol C*. 1989;94:431-434
37. Aldasoro M, Martinez C, Vila JM, Flor B, Lluch S. Endothelium-dependent component in the contractile responses of human omental arteries to adrenergic stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1993;250:103-107
38. Martinez C, Cases E, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Marco V, Lluch S. Influence of endothelial nitric oxide on neurogenic contraction of human pulmonary arteries. *Eur Respir J*. 1995;8:1328-1332
39. Ignarro JL BR, Buga GM et al. 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*. 1988:181-189
40. Murad F SW, C Molina, B Bennett. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic gmp in vascular relaxation. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1987:65-76
41. Palmer RMJ RD, Ashton DS, Moncada S. . L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988:1251-1256

42. Rees DD PR, Hodson HF, Moncada S. . A specific inhibitor of nitric oxide formation from l-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989:418-424
43. Moncada S PR, Higgs EA. . Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. . *Pharmacol Rev* 1991:109-142
44. Waldman S MF. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: The guanylate cyclase-cyclic gmp system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988:115-118
45. Feletou MaV, P.M. Edhf: The complete story. *CRC Press, Taylor and Francis. Bocaaton, FL.* 2005
46. Furchgott RF VP. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989:2007-2018
47. Segarra G MP, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Torondel B, Lluch A. . Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens* 2001:1142-1148
48. Suzuki. The electrogenic na-k pump does not contribute to endothelium-dependent hyperpolarization in the rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol* 1988:295-297
49. Chen G SH. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 1989;410:91-106

50. Nakashima M MJ, Taylor AA, Vanhoutte PM. . Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993:2867-2871
51. Petersson J ZP, Brandt L, Högestätt ED. . Substance p-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1995:889-894
52. Urakami-Harasawa L SH, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997:2793-2799
53. Wallerstedt SM BM. Endothelium-dependent relaxation by substance p in human isolated omental arteries and veins: Relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br J Pharmacol* 1997:25-30
54. Nishikawa Y SD, Chilian WM. . Nitric oxide exerts feedback inhibition on edhf-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;aug:H459 -65279:H65459-H65465
55. Popp R BR, Ott G, Busse R, Fleming I. . Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 2002:800-806
56. Fisslthaler B PR, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. . Cytochrome p450 2c is an edhf synthase in coronary arteries. *Nature* 1999:493-497

57. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996:415-423
58. Yada T SH, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. . Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 2003:1040-1045
59. Matoba T SH, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa T, Takeshita A. . Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002:909-913
60. Randall MD AS, Bennet T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. . An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 1996:114-120
61. Chauhan SD NH, Ahluwalia A, Hobbs AJ. . Release of c-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci* 2003:1426-1431
62. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte P, Weston A. Edhf: Bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002:374-380
63. Griffith TM CA, Taylor HJ, Giddings BD, Edwards DH. Camp facilitates edhf-type relaxations in conduit arteries by

- enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci* 2002;6392-6397
64. Edwards G DK, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. . *Nature* 1998;269-272
65. Davis MJ HM. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 1999;387-423
66. Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:28-38
67. Quayle JM NM, Standen NB. . Atp-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997;77:1165-1232
68. WF. J. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000;35:173-178
69. Nelson MT CH, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. . *Science* 1995. 1995;270:633-637
70. Nelson MT QJ. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:799-822
71. Faraci FM SC. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1047-1063

72. Nichols CG LA. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1997;59:171-191
73. Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993;16
74. Caesar K, Akgoren N, Mathiesen C, Lauritzen M. Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats. *J Physiol* 1999;520:281-292
75. Edwards FR HG, Silverberg GD. . Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol* 1988;404:455-466
76. Chrissobolis S ZJ, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG. . Role of inwardly rectifying k(+) channels in k(+)-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:2704-2712
77. Knot HJ ZP, Nelson MT. . Extracellular k(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier k(+) channels. *J Physiol* 1996;492:419-430
78. Robertson BE NM. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of k⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 1994;267:1589-1597

79. Quan L, Sobey CG. Selective effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral vascular responses to 4-aminopyridine in rats. *Stroke* 2000. 2000;31:2460-2465
80. Aiello EA, Walsh MP, Cole WC. Phosphorylation by protein kinase a enhances delayed rectifier k⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;268:926-934
81. Zhao YJ WJ, Rubin LJ, Yuan XJ. . Roles of k⁺ and cl⁻ channels in camp-induced pulmonary vasodilation. *Exp Lung Res* 1998
82. Sobey CG FF. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1999;126:1437-1443
83. Zhao YJ WJ, Rubin LJ, Yuan XJ. . Inhibition of k(v) and k(ca) channels antagonizes no-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol* 1997;272:904-912
84. Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP, Cole WC. Protein kinase c inhibits delayed rectifier k⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996;271:109-119
85. Knot HJ SN, Nelson MT. . Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [ca²⁺] in cerebral arteries of rat via ca²⁺-dependent k⁺ channels. *J Physiol* 1998;508:211-221

86. Eichler I WJ, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Kohler R. . Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^{+} -channels suppresses endothelium-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol.* 2003;138:594-601
87. Kohler R DC, Kuhn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. . Expression and function of endothelial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res* 2000;87:496-503
88. Desmadryl G, Hilaire C, Vignes S, Diochot S, Valmier J. Developmental regulation of T -, N - and L -type calcium currents in mouse embryonic sensory neurones. *Eur J Neurosci.* 1998;10:545-552
89. Zwingman TA, Neumann PE, Noebels JL, Herrup K. Ricker is a new variant of the voltage-dependent calcium channel gene *Ca_v1a*. *J Neurosci.* 2001;21:1169-1178
90. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature.* 1994;372:97-100
91. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1985;86:1-30
92. Fisher M, Grotta J. New uses for calcium channel blockers. Therapeutic implications. *Drugs.* 1993;46:961-975

93. Fleckenstein A, Frey M, Fleckenstein-Grun G. [possibilities in the future application of calcium antagonists. Is the prevention of blood vessel calcinosis possible?]. *Fortschr Med.* 1984;102:713-717
94. Boland LM, Morrill JA, Bean BP. Omega-conotoxin block of n-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* 1994;14:5011-5027
95. Bossu JL, De Waard M, Feltz A. Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1991;437:621-634
96. Kurihara T TTA. "N-type Ca^{2+} channel". . *Nippon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica* 2003;121:211-222
97. Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P. Regulation by synapsin i and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase ii of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol.* 1991;436:257-282
98. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 1992;9:85-95
99. Bertolino M, Llinas RR. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1992;32:399-421
100. Teramoto T, Niidome T, Miyagawa T, Nishizawa Y, Katayama K, Sawada K. Two types of calcium channels

- sensitive to omega-agatoxin- tk in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroreport*. 1995;6:1684-1688
101. Martinez MC VJ, Aldasoro M, Medina P et al. The human diferential artery: Endothelium-mediated contraction in response to adrenergic stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1994;261:73-78
102. Martinez MC CE, Vila JM, Aldasoro M et al. Influence of endothelial nitric oxid on neurogenic contraction of human pulmonary arteries. *Eur Respir J*. 1995;8:1328-1332
103. Jackson WF, Blair KL. Characterization and function of ca(2+)-activated k+ channels in arteriolar muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;274:H27-34
104. Rusch NJ, De Lucena, R. G., Wooldridge, T. A., England, S. K., Cowley, A. W., Jr. A ca(2+)-dependent k+ current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;19:301-307
105. Paterno R, Heistad DD, Faraci FM. Functional activity of ca2+-dependent k+ channels is increased in basilar artery during chronic hypertension. *Am J Physiol*. 1997;272: H1287-1291
106. Gelband CH, Hume JR. [ca2+]i inhibition of k+ channels in canine renal artery. Novel mechanism for agonist-induced membrane depolarization. *Circ Res*. 1995;77:121-130

107. Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol.* 1989;166:319-323
108. Glocker S, Quast U. Binding and effects of p1075, an opener of atp-sensitive k⁺ channels, in the aorta from streptozotocin-treated diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;356:210-215
109. Bouchard JF, Dumont EC, Lamontagne D. Modification of vasodilator response in streptozotocin-induced diabetic rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999;77:980-985
110. Ikenaga H, Bast JP, Fallet RW, Carmines PK. Exaggerated impact of atp-sensitive k(+) channels on afferent arteriolar diameter in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:1199-1207
111. Li H, Forstermann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190:244-254
112. Najibi S, Cohen RA. Enhanced role of k⁺ channels in relaxations of hypercholesterolemic rabbit carotid artery to no. *Am J Physiol.* 1995;269:H805-811
113. Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, Cohen RA. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol.* 1994;266:H2061-2067

114. Quan L, Sobey CG. Selective effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral vascular responses to 4-aminopyridine in rats. *Stroke*. 2000;31:2460-2465
115. Szentivanyi M, Jr., Berczi V, Huttl T, Reneman RS, Monos E. Venous myogenic tone and its regulation through k⁺ channels depends on chronic intravascular pressure. *Circ Res*. 1997;81:988-995
116. Golledge J, Gosling M, Turner RJ, Standfield NJ, Powell JT. Arterial flow induces changes in saphenous vein endothelium proteins transduced by cation channels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;19:545-550
117. Cauvin C, Malik S. Induction of ca⁺⁺ influx and intracellular ca⁺⁺ release in isolated rat aorta and mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of alpha-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984;230:413-418
118. Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell ca²⁺. *Pharmacol Rev*. 1988;40:87-119
119. Jeremy JY, Dandona P. Effect of endothelium removal on stimulatory and inhibitory modulation of rat aortic prostacyclin synthesis. *Br J Pharmacol*. 1989;96:243-250
120. Jeremy JY, Mikhailidis DP, Dandona P. Adrenergic modulation of vascular prostacyclin (pgi₂) secretion. *Eur J Pharmacol*. 1985;114:33-40

121. Callow ID, Campisi P, Lambert ML, Feng Q, Arnold JM. Enhanced in vivo alpha1- and alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction with indomethacin in humans. *Am J Physiol*. 1998;275:H837-843
122. Aldasoro M, Mauricio MD, Serna E, Cortina B, Medina P, Segarra G, Novella S, Vila JM. Aspirin and cox-2 inhibitor nimesulide potentiate adrenergic contractions of human gastroepiploic artery. *Am J Hypertens*. 2007;20:514-519
123. Moncada S RM, Palmer RMJ. Endothelium derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*. 1988;37:2495-2501
124. Moncada S PR, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous vasodilator. *hypertension*. 1988;12:365-372
125. Palmer RMJ FA, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526
126. Segarra G, Lluch P, Mauricio MD, Vila JM, Medina P, Martinez-Leon JB, Aldasoro M, Lluch S. Contractile hyporesponsiveness to norepinephrine of forearm veins in chronic renal failure. *Am J Hypertens*. 2006;19:818-822
127. Ortega J, Vila JM, Mauricio MD, Segarra G, Medina P, Martinez-Leon JB, Lluch S. Nitric oxide mediates abnormal responsiveness of thyroid arteries in methimazole-treated patients. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:551-556

128. Serna E, Mauricio MD, Lluch P, Segarra G, Cortina B, Lluch S, Medina P. Basal release of nitric oxide in the mesenteric artery in portal hypertension and cirrhosis: Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28:880-886
129. Fabi F, Argiolas L, Chiavarelli M, Del Basso P. Nitric oxide-dependent and -independent modulation of sympathetic vasoconstriction in the human saphenous vein. *Eur J Pharmacol*. 1996;309:41-50
130. Yang ZH, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF. Different activation of the endothelial l-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ Res*. 1991;68:52-60
131. Linda C. *Fisiologia*. Elsevier Saunders.
132. Westcott EB SS. Perivascular innervation: A multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling. *Microcirculation*. 2013 2013;Apr 20(3):217-238
133. Simonsen U PD, Delgado JA, Hernández M, Resel L, Saenz de Tejada I, García-Sacristán A. Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(3):269-275
134. Segarra G MP, Domenech C, Martínez León JB, Vila JM, Aldasoro M, Lluch S. Neurogenic contraction and

- relaxation of human penile deep dorsal vein. . *Br J Pharmacol.* . 1998;124(4):788-794.
135. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997;100:2793-2799
136. Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E, et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med.* 1988;319:462-467
137. Garcia ML, Knaus HG, Munujos P, Slaughter RS, Kaczorowski GJ. Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *Am J Physiol.* 1995;269:C1-10
138. Martinez-Leon JB, Segarra G, Medina P, Vila JM, Lluch P, Peiro M, Otero E, Lluch S. Ca²⁺-activated k⁺ channels mediate relaxation of forearm veins in chronic renal failure. *J Hypertens.* 2003;21:1927-1934
139. Furchgott RF, FASEB J, 1989
140. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999;99: 3092-3095
141. M F. Endothelial dysfunction: A multifaceted disorder. . *Physiol* 2006;291:985-1002

142. al. M-Le. Ca²⁺- activated k⁺ channels mediated relaxation of forearm veins in chronic renal failure. *J Hypertens* 2003;19:27-1934
143. Knot HJ NM. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent k⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol* 1995;269:348-355
144. Asano M, Masuzawa-Ito K, Matsuda T, Suzuki Y, Oyama H, Shibuya M, Sugita K. Increased ca²⁺ influx in the resting state maintains the myogenic tone and activates charybdotoxin-sensitive k⁺ channels in dog basilar artery. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:969-977
145. Ren Z FS, Furnary, A., Liu M., Gately H., Swanson J., Ahmad A. , Yim A. P., He G. W. Effects of potassium channel opener krn4884 on human conduit arteries used as coronary bypass grafts. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50:154-160
146. Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y. Sulphonylurea receptor 2b and kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but atp-insensitive k⁺ channel. *J Physiol.* 1997;499 (Pt 3):715-720
147. Takata Y, Shimada F, Kato H. Differential effects of diazoxide, cromakalim and pinacidil on adrenergic neurotransmission and 86rb⁺ efflux in rat brain cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:1293-1301
148. Oe K. SB, Santha E., et al. Modulation of norepinephrine release by atp-dependent k⁺-channel activators and

- inhibitors in guinea pig and human isolated right atrium. *Cardiovasc Res* 1999;43:125–134.
149. Schotborgh CE, Wilde AA. Sulfonylurea derivatives in cardiovascular research and in cardiovascular patients. *Cardiovasc Res*. 1997;34:73-80
150. Cole WC, Clement-Chomienne O. ATP-sensitive k⁺ channels of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:94-103
151. Hambrock A, Loffler-Walz C, Russ U, Lange U, Quast U. Characterization of a mutant sulfonylurea receptor sur2b with high affinity for sulfonylureas and openers: Differences in the coupling to kir6.X subtypes. *Mol Pharmacol*. 2001;60:190-199
152. Kirpekar M, Kirpekar SM, Prat JC. Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. *J Physiol*. 1977;272:517-528
153. Leander S, Arner A, Johansson B. Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1977;46:351-361

