

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**Valoración de los efectos de la milrinona
sobre la circulación pulmonar y
sistémica: Función del
óxido nítrico.**

TESIS DOCTORAL

Javier García Fernández

Madrid. 1996

**Valoración de los efectos de la milrinona
sobre la circulación pulmonar y
sistémica: Función del
óxido nítrico.**

TESIS DOCTORAL

Javier García Fernández

Director: Prof. D. Francisco López Timoneda

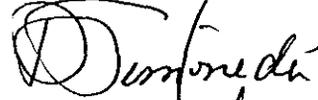
Madrid. 1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Como Director de la Tesis Doctoral: "VALORACION DE LOS EFECTOS DE LA MILRINONA SOBRE LA CIRCULACION PULMONAR Y SISTEMICA. FUNCION DEL OXIDO NITRICO", realizada por el Dr. JAVIER GARCIA FERNANDEZ, considero que reune los requisitos necesarios, tanto en el planteamiento del trabajo como en la metodología empleada, para ser defendida ante el Tribunal calificador.

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



1-October-1996

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

Fdo.: Prof. F. López Timoneda
(Fecha y firma)

DNI

DNI 4.103.998

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

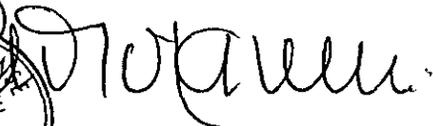
El Consejo del Departamento de Farmacología acordó INFORMAR FAVORABLEMENTE la admisión a trámite de la Tesis Doctoral presentada por D. Javier García Fernández y dirigida por el Prof. Francisco López Timoneda, Catedrático de este Departamento.

Madrid, 16 de Octubre, 1996

Fecha reunión
Consejo Departamento

16-10-96

El Director del Departamento



Prof. P. LORENZO
(Fecha y firma)

A mi mujer.

Y

A mi hijo.

Agradecimientos.

Quisiera expresar en estas líneas mi sincero agradecimiento a cuantos durante todos estos años me han prestado su apoyo para poder llevar a cabo la realización de este trabajo.

En primer lugar, al **Prof. D. Francisco López Timoneda**, director de este trabajo, por haberme entregado todo su afecto y ciencia. Le agradezco el total desprendimiento de su tiempo y paciencia para que este esfuerzo tuviese los mejores resultados.

Al **Prof. D. Pedro Lorenzo Fernández**, Director del Departamento de Farmacología, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi Doctorado en el mismo, y por su apoyo en todo momento.

A **Mayte**, mi mujer, por haber sido mi motor principal durante todo este tiempo y por haberme prestado, sin escatimar en un solo momento todo su apoyo, esfuerzo y cariño.

A **Javier**, mi hijo, por dedicarme cada día su cariñosa y dulce sonrisa, pese al escaso tiempo que le he podido dedicar durante estos duros años, y que ha supuesto siempre para mi un constante estímulo.

Al **Prof. D. Angel Nogales Espert**, por todos sus buenos y acertados consejos que me han guiado por la Licenciatura de Medicina, la oposición M.I.R., mi especialidad en Anestesiología y Reanimación, y más que nunca en la realización de esta Tesis Doctoral. Por todo ello siempre contará con mi más sincero respeto, admiración y cariño.

Al **Prof. D. Albino García Sacristán**, por su desinteresada e imprescindible ayuda para realizar este trabajo, al dejarme trabajar en sus Laboratorios del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M., no escatimando nunca consejos, enseñanzas, apoyo y simpatía.

A la **Profa. Dña. María del Carmen Gasco García**, por su constante ayuda, apoyo y dedicación en la realización de este trabajo, demostrando que es una persona siempre dispuesta a ayudar a los demás en todo momento, y con la que toda persona que la conociera desearía trabajar.

A mi hermano **José Luis**, por su dedicación en la enseñanza de un mundo nuevo y apasionante para mí, demostrando tener una gran paciencia, al igual que un gran dominio y destreza para transmitir sus valiosos conocimientos y su constante apoyo. También deseo expresar mi agradecimiento a mi hermana **Paloma**, por sus consejos en las técnicas de experimentación animal.

A mis **padres**, por la desinteresada ayuda y gran dedicación que me han prestado, ofreciéndome siempre la mejor formación científica y humana que unos padres pueden dar.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria y del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por el agradable ambiente de trabajo y convivencia que compartieron conmigo, y por su incondicional colaboración en todo momento.

A todos mis compañeros del Hospital “ La Paz “ de Madrid, por formarme como Anestesiólogo y Reanimador, y por no cesar nunca de animar, ayudar y facilitar todo lo que han podido mi trabajo.

Clave de abreviaturas

A.D.P. :	Difosfato de adenosina.
A.M.P.c :	Acido adenosin-3',5'-fosfórico cíclico.
A.T.P. :	Trifosfato de adenosina.
Ca ²⁺ :	Calcio.
ClH :	Acido clorhídrico.
Clk :	Cloruro potásico.
dp / dt :	Velocidad de desarrollo de presión.
E.D. ₅₀ :	Dosis eficaz cincuenta.
E.D.C.F. :	Factor contráctil derivado del endotelio.
E.D.H.F. :	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
E.D.R.F. :	Factor relajante derivado del endotelio.
E.T. :	Endotelina.
E.T.V. _L :	Volumen pulmonar de agua extravascular (por termodilución).
F.D.A. :	Asociación Americana de Fármacos y Alimentos.
G.M.P.c :	Acido guanosin-3',5'-fosfórico cíclico.
G.T.P. :	Trifosfato de guanosina.
5-HT :	5-hidroxitriptamina.
I.D. ₅₀ :	Dosis inhibitoria cincuenta.
I.L. :	Interleucina.
L-Arg :	L-arginina.
L-HOArg :	Hidroxi-L-arginina.
L-NA :	N ^G -nitro-L-arginina.
L-NAME :	N ^G -nitro-L-arginina metil éster.
L-NIO :	N ^G -iminoethyl-L-ornitina.
L-NMMA :	N ^G -monometil-L-arginina.
N.A. :	Noradrenalina.
N.A.D.P.H. :	Forma reducida del fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida.
NO :	Oxido nítrico.
NO ₂ :	Dióxido de nitrógeno.
NO ²⁻ :	Anión nitrito.
NO ³⁻ :	Anión nitrato.
N.Y.H.A. :	Asociación Neoyorquina del Corazón.
P.A.F. :	Factor activador de plaquetas.
PaO ₂ :	Presión parcial de oxígeno en sangre arterial.
P.A.P.M. :	Presión pulmonar arterial media.
pD ₂ :	- logaritmo en base diez de la E.D. ₅₀ .
P.D.E. :	Fosfodiesterasa.
P.G. :	Prostaglandina.
P.N.A. :	Péptido natriurético auricular.
P.R.G.C. :	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
R.V.P. :	Resistencias vasculares pulmonares.
S.N.C. :	Sistema nervioso central.
T.G.F. :	Factor de crecimiento tumoral.
V.I.P. :	Péptido intestinal vasoactivo.

Indice

Página

I. Introducción	1
1. Justificación	2
2. Métodos de investigación cardiovascular <i>in vitro</i>	6
2.1. Registro isométrico de segmentos vasculares aislados	7
3. Regulación del tono vascular	9
3.1. Vía de la L - arginina - óxido nítrico (E.D.R.F.)	11
3.2. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (E.D.H.F.).	20
3.3. Factores contráctiles derivados del endotelio (E.D.C.F.) ..	22
3.4. Metabolitos del ácido araquidónico	23
3.5. Agregación plaquetaria y tono vascular	25
3.6. Péptidos vasoactivos ⁰	27
3.7. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	28
3.8. Nervios perivasculares	34
4. Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca	38
4.1. Repercusiones en la circulación sistémica y pulmonar	39
5. Fármacos inotrópicos positivos	43
5.1. Digitálicos	43
5.2. Simpaticomiméticos	44
5.3. Inhibidores de fosfodiesterasas del grupo III	53
II. Planteamiento y Objetivos	70
1. Planteamiento	71
2. Enumeración de objetivos	73
III. Material y Método	75
1. Material	76
1.1. Animales	76
1.2. Sistemas de registro	77
1.3. Reactivos, productos químicos y fármacos utilizados	78
2. Método	81

2.1.	Procedimiento experimental	81
2.2.	Tensión basal	85
2.3.	Diseños experimentales	88
2.4.	Determinación de curvas dosis - respuesta	92
2.5.	Análisis estadístico	94
IV. Resultados			95
1.	Estadística descriptiva	96
1.1.	Animales	96
1.2.	Relación tensión pasiva - contracción	96
1.3.	Respuesta vasoconstrictora	99
1.4.	Respuesta vascular a marcadores endoteliales	116
1.5.	Curvas dosis - respuesta de la milrinona	127
2.	Inferencia estadística	145
V. Discusión			151
1.	Discusión metodológica	152
2.	Discusión de resultados	154
2.1.	Estudios de respuesta vascular vasoconstrictora	154
2.2.	Estudios de respuesta vascular a marcadores endoteliales..	156
2.3.	Respuesta vascular pulmonar y femoral a la milrinona.....	158
VI. Conclusiones			175
VII. Bibliografía			178

I. Introducción

1. Justificación

En las situaciones graves de insuficiencia cardíaca aguda los agentes inotrópicos positivos son el principal tratamiento de soporte, mientras se corrige la causa que está desencadenando ese fallo cardíaco. Las principales características del inotrópico positivo ideal, en situaciones de bajo gasto cardíaco, serían: que se pueda administrar intravenosamente, que posea una vida media corta, y un comienzo de acción rápido, siendo preferibles aquellos que disminuyan la precarga y la postcarga, al reducir las presiones de llenado y la tensión de las paredes ventriculares, así como las resistencias vasculares y, por tanto la reducción del trabajo cardíaco. (1,2)

También es importante que consiga el mayor aumento posible de la contractilidad miocárdica sin aumentar el consumo de oxígeno del miocardio, no debe ser taquicardizante, ni disminuir el flujo sanguíneo coronario, debe favorecer la relajación diastólica de ambos ventrículos, y seguir siendo activo en situaciones de insuficiencia cardíaca congestiva avanzada, en la que se ha descrito una regulación a la baja de los receptores cardíacos simpáticos y un desarrollo muy precoz de fenómenos de taquifilaxia con el empleo de agentes simpaticomiméticos. (1,2,3,4,5,6)

Se ha venido empleando frecuentemente, en situaciones agudas de bajo gasto cardíaco agentes inotrópicos simpaticomiméticos, combinados con vasodilatadores potentes, en las situaciones más graves. En los últimos años disponemos de una nueva familia de fármacos inotrópicos positivos

intravenosos con efectos vasodilatadores directos, los inhibidores de las fosfodiesterasas del grupo III de nucleótidos cíclicos.^(1,2,3,4,5,6,7,8)

El primero de estos fármacos inhibidores de las fosfodiesterasas del grupo III que se utilizó clínicamente fue la amrinona, con la que se empezó a vislumbrar los beneficios de disponer de un fármaco que simultáneamente es inotrópico positivo y vasodilatador, lo que suponía una ventaja clara en situaciones de fracaso ventricular predominantemente derecho, sobre todo, si se asociaba esta situación con hipertensión pulmonar. Se comprobó su utilidad en las situaciones de bajo gasto cardíaco refractarias al tratamiento simpaticomimético, bien por regulación a la baja de los receptores adrenérgicos, o bien por situaciones de taquifilaxia al tratamiento inotrópico simpaticomimético de larga duración. Pero la amrinona pronto fue desplazada por un derivado de la misma, la milrinona, inhibidor selectivo de la familia de fosfodiesterasas GMP cíclico inhibidas o grupo III, que presenta una potencia inotrópica mayor, con menos efectos secundarios y una vida media más corta que la amrinona.^(9,10,11,12,13,14,15,16,17,18)

La milrinona es un fármaco derivado biperidínico, que provoca un incremento de AMPc intracelular al inhibir la enzima que lo degrada en diferentes territorios. En el miocito cardíaco, el aumento de AMPc conlleva de forma simultánea, un aumento de la conductancia de los canales lentos de calcio (Ca^{2+}) y una activación del fosfolambano, lo que provoca una mayor biodisponibilidad de Ca^{2+} citosólico y una mayor velocidad de recaptación del Ca^{2+} intracelular por parte del retículo sarcoplásmico,

aumentando la contractilidad miocárdica en la sístole y acelerando la relajación diastólica, con un importante efecto inotrópico y lusitrópico positivo. (17,18,19,20,21,22,23,24,25)

En la fibra lisa vascular, el aumento de AMPc provoca junto al GMPc relajación vascular, en todos los territorios arteriales: sistémico, pulmonar y coronario; y también, en el venoso. Por último, el incremento de AMPc en la fibra lisa bronquial provoca una relajación de la misma produciendo broncodilatación. Debido a que la milrinona actúa sobre un segundo mensajero, inhibiendo la fosfodiesterasa III degradadora de AMPc, su acción inotrópica se conserva en las situaciones de regulación a la baja de los receptores simpáticos y en las situaciones de taquifilaxia a las catecolaminas, no sólo no interfiriendo en su acción farmacológica sino que actúa amplificando y potenciando la respuesta simpática. (17,18,19,20, 21,22,23,24,25,26,27,28)

Desde su introducción en España en 1991, como agente de apoyo inotrope intravenoso durante cortos periodos de tiempo, se ha visto su especial beneficio en las insuficiencias cardíacas agudas y graves con índices cardíacos menores de 2 l / m^2 , y con un predominio de fallo ventricular derecho con hipertensión pulmonar. En estas situaciones la milrinona se ha mostrado novedosa frente a los otros fármacos inotrópicos positivos intravenosos de los que disponemos.

Por ello, los estudios sobre la milrinona se centraron al principio sólo en sus efectos inotrópicos positivos, dejando a un lado su efecto vasodilatador, al considerarlo como un efecto colateral del fármaco. Hoy estos estudios han cambiado y actualmente se presenta la milrinona como un fármaco inotrópico positivo y vasodilatador potente, incluso algunos autores hablan de este fármaco como, un agente vasodilatador directo con efectos positivos sobre la contractilidad miocárdica. (29,30,31,32,33,34,35,36,37,38)

Por tanto, sería interesante conocer más detalladamente los efectos vasodilatadores de la milrinona en todos los territorios vasculares, fundamentalmente, la comparación entre los territorios sistémico y pulmonar, ya que sus efectos inotrópicos han sido ya bien caracterizados y muy probablemente, muchos de los efectos beneficiosos que aporta la milrinona frente al resto de inotropos adrenérgicos se deban a sus efectos vasodilatadores. Sería bueno conocer si la milrinona presenta alguna selectividad vasodilatadora, aunque parcial, sobre el territorio vascular pulmonar frente el territorio vascular sistémico y si esta selectividad parcial, es la que podría justificar el beneficio que este fármaco aporta a los pacientes con fallo ventricular predominantemente derecho, o simplemente, se debe esta ventaja a que el ventrículo derecho se beneficia más de una disminución clara de la postcarga que de un aumento neto de la contractilidad, o lo que optimiza la función del ventrículo derecho son ambas situaciones de forma simultánea con un mismo fármaco que realiza ambas funciones sincronizadamente.

Antes de plantear nuestro trabajo, revisaremos en este primer apartado, algunos aspectos generales sobre las técnicas de estudio cardiovascular *in vitro*, los mecanismos de regulación vasomotora endoteliales, musculares y nerviosos, las repercusiones fisiopatológicas de la insuficiencia cardíaca sobre la circulación sistémica y pulmonar, y sobre fármacos inotrópicos intravenosos, haciendo una revisión más extensa sobre las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y sus inhibidores, y muy especialmente sobre la milrinona.

2. Métodos de investigación cardiovascular *in vitro*

El comportamiento fisiológico y farmacológico de los vasos arteriales se estudia mejor en la circulación sistémica intacta. Sin embargo, al estudiar un aspecto concreto de la fisiología vascular o un efecto farmacológico determinado en un tipo de región anatómica, el diseño experimental se complica enormemente en la circulación intacta, ya que multitud de mecanismos fisiológicos endoteliales, musculares y nerviosos se interrelacionan simultáneamente, y hacen difícil sacar consecuencias concretas de dichos experimentos.

Por otro lado, en las preparaciones *in vitro* podemos controlar y medir cada uno de estos mecanismos de modulación vascular por separado, y

determinar el papel que ejercen cada uno de ellos independientemente, sobre la respuesta que encontramos conjuntamente en el organismo vivo.

Los dos métodos de investigación más extendidos hoy día, para el estudio de segmentos vasculares aislados son: el de anillos de vasos sujetos por dos alambres sometidos a una determinada tensión, y los de vasos canulados y presurizados, a los que se les puede perfundir intraluminalmente o no. En ambos métodos, los fragmentos arteriales permanecen en todo momento bañados por una solución fisiológica de electrolitos y glucosa tamponada, a una temperatura determinada y con un sistema continuo de oxigenación, todo ello para intentar en lo posible que las células de los segmentos vasculares se encuentren en situación óptima de funcionamiento, lo más parecida a su estado en el organismo. A continuación, es cuando se van introduciendo los fármacos o reactivos que necesitemos según el estudio a realizar en el baño de órganos; con cada uno de ellos, bloqueamos o activamos una determinada vía de regulación vasomotora. (39,40,41)

2.1. Registro isométrico de segmentos vasculares aislados

La disposición circunferencial de las fibras musculares lisas de los vasos arteriales de pequeño calibre hace posible que el estudio de pequeños segmentos cilíndricos de arterias aislados, nos reflejen con exactitud la

regulación del tono vascular. Estos segmentos cilíndricos permiten al mismo tiempo introducir a lo largo de su luz dos alambres acerados, que nos van a servir para que la pared del vaso transmita su fuerza de contracción al alambre y podamos medir los cambios de tensión de la pared vascular.

El primer miógrafo diseñado de esta forma y con este fin fue realizado por Bevan y Osher en 1972 ⁽⁴⁰⁾, y posteriormente mejorado por Mulvany y Halpern en 1976 ⁽⁴²⁾. Estos miógrafos registran variaciones de tensión, a una longitud determinada de separación entre los dos alambres que no varía a lo largo del experimento, por lo que se denominan registros isométricos. También se han desarrollado transductores para estudiar segmentos de anillos vasculares en registros isotónicos, es decir, donde la tensión se mantiene constante y lo que varía es el radio del vaso, para intentar realizar una aproximación más fisiológica al comportamiento *in vivo*. Sin embargo, este tipo de modelo experimental tiene una mayor complejidad técnica y metodológica, que hace que esté más sujeto a variaciones de preparación y no aporta grandes beneficios a la técnica de registro isométrico.

En los registros isométricos, una cuestión importante es cómo calcular la longitud a la que hay que separar los dos alambres mediante el tornillo micrométrico, para distender las paredes del vaso, y obtener la denominada tensión basal. Para determinar esta tensión que es diferente para cada territorio vascular, cada diámetro del vaso y cada especie animal, se analiza la respuesta vascular contráctil a un agonista vasoconstrictor,

habitualmente al Clk, después de exponer las arterias a distintas tensiones, al azar, y progresivamente. La tensión pasiva a la que se obtiene la máxima respuesta a ese agonista vasoconstrictor, es la que se considera como tensión basal de respuesta vascular, reflejo del comportamiento de ese vaso *in vivo*. También puede calcularse teóricamente a partir de la Ley de Laplace, conociendo los datos morfométricos del segmento vascular montado.^(39,40, 41,42)

3. Regulación del tono vascular

En los últimos años, hemos asistido a un grandioso avance en los conocimientos fisiológicos y fisiopatológicos del endotelio, de tal forma que hoy nadie duda que el endotelio constituye un elemento fundamental en la regulación de la fisiología cardiovascular. En 1966, el premio Nobel Lord Adrian Florey ⁽⁴³⁾ consideró el endotelio como una barrera aislante entre la sangre y la pared vascular, y lo denominó *capa de celofán*; él mismo predijo que en los siguientes años, habría grandes descubrimientos sobre el endotelio. Así ha sucedido y desde 1980, en la literatura internacional, aparecen más de 950 artículos estudiando diferentes aspectos de la fisiología endotelial, hasta nuestros días en donde este número se ha multiplicado considerablemente, existiendo en la actualidad más de 6.500 artículos en 1995, según búsqueda realizada en la línea de información médica informatizada Medline ⁽⁴⁴⁾. Esto pone en evidencia, el papel claramente

protagonista que el endotelio ha adquirido en todas las diferentes áreas del saber médico, que inicialmente sólo se extendía a las revistas de ciencias básicas experimentales y que actualmente ha invadido todas y cada una de las especialidades médicas y quirúrgicas, en las que poco a poco se van traduciendo las repercusiones clínicas correspondientes.

La célula endotelial interviene en varias funciones fisiológicas, entre ellas destacan: a) angiogénesis, dirigiendo y activando la formación de nuevos vasos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; b) coagulación, el endotelio sintetiza el factor procoagulante V, la proteína S, secreta el activador del plasminógeno, y presenta en su membrana los anticoagulantes trombomodulina y heparán - sulfato; c) agregación plaquetaria, el endotelio actúa como antiagregante plaquetario, y a la vez es el encargado de sintetizar el factor de von Willebrand; d) respuesta inmune e inflamación, el endotelio presenta receptores específicos leucocitarios de los que depende la adhesión celular, además el endotelio sintetiza y se ve a la vez influido, por la mayoría de los mediadores y citoquinas de la inflamación y respuesta inmune; e) funciones metabólicas, el endotelio metaboliza multitud de sustancias, entre otras tenemos: noradrenalina, adenosina, serotonina, bradicinina, nucleótidos de adenina, leucotrienos, prostaglandinas, sustancia P, etc..., además inhibe la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas, y participa en la conversión de la angiotensina I a angiotensina II; f) regulación del tono vascular, los endotelios sintetizan una serie de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras encargadas en su conjunto, de modular el grado de

contracción del músculo liso vascular, y con ello el tono de la pared arterial y la presión arterial. La síntesis de estos factores derivados del endotelio dependen de multitud de sustancias y factores que estimulan a los endotelios hacia la síntesis de uno u otros factores. (40,43,45,46,47,48,49,50)

3.1. Vía de la L - arginina - óxido nítrico (E.D.R.F.)

En 1980, Furchgott y Zawadzki ⁽⁵¹⁾ observaron en segmentos aislados de aorta torácica de conejo, que la administración de acetilcolina provocaba en unas preparaciones vasodilatación y en otras vasoconstricción. Al investigar estos resultados aparentemente contradictorios, descubrieron que la pérdida del efecto vasodilatador de la acetilcolina se debía a la desendotelización, no intencionada, de la íntima de los vasos durante su preparación y demostraron que la relajación sólo se produce si existen células endoteliales funcionales. Asimismo, estos autores demostraron que la acetilcolina, actuando sobre los receptores muscarínicos endoteliales, estimula la liberación de una sustancia endotelial que causa la relajación del músculo liso vascular, y la denominaron, al no conocer su naturaleza, como Factor Relajante Derivado del Endotelio (E.D.R.F.). Posteriormente se demostró que otras muchas sustancias vasodilatadoras (bradicinina, sustancia P, trombina, histamina, calcitonina, péptido intestinal vasoactivo,

entre otras muchas) producían relajación de la fibra lisa vascular por liberación del E.D.R.F. (Tabla I).(51, 52,53,54)

Gruetter y col. en 1981 (55) , demostraron que los nitrovasodilatadores (nitroprusiato sódico y nitroglicerina), relajantes de la musculatura lisa vascular, eran metabolizados en los miocitos para producir óxido nítrico, y que era éste el que provocaba la relajación de la fibra muscular lisa mediante la producción de GMP cíclico. No en vano ya en el siglo XIX se había observado que los nitratos orgánicos mejoraban los síntomas del *angor pectoris*, incluso Alfred Nobel, cuya fortuna y fama se basó en la invención de la dinamita, escribió a un amigo en 1895 sobre la ironía que suponía que su médico le mandara tomar nitroglicerina para su dolencia.(56)

En 1987, por un lado Palmer y col. (57) , estudiando la liberación de E.D.R.F. y óxido nítrico de cultivos endoteliales, determinaron la producción de óxido nítrico por quimioluminiscencia y midieron la actividad relajante del E.D.R.F. y del óxido nítrico por bioensayo. La relajación producida por el E.D.R.F. fue comparable a la producida por el óxido nítrico, ambas sustancias eran igualmente inestables y la relajación producida por el óxido nítrico y el E.D.R.F. fue inhibida por hemoglobina y aumentada por superóxido dismutasa de manera similar. Como el óxido nítrico liberado por las células endoteliales era indistinguible del E.D.R.F. en términos de actividad biológica, estabilidad y susceptibilidad, estos autores sugirieron que el óxido nítrico y el E.D.R.F. eran lo mismo. (57)

Por otro lado y simultáneamente, Ignarro y col. (58,59), demostraron que el E.D.R.F. liberado de arterias y venas intactas, y la solución acuosa de óxido nítrico, presentaban idénticas propiedades farmacológicas y químicas, y por análisis espectrofotométrico tenían igual comportamiento, lo que les llevó a la misma conclusión que Palmer (57). Actualmente existe gran controversia a este respecto, y se piensa que existen otros E.D.R.F. diferentes al óxido nítrico. (47,49,50,60,61,62,63)

TABLA.I Activadores de la liberación de E.D.R.F.

1. Fisiológicos:

- Cambios del flujo sanguíneo.
- Estrés de la pared vascular.
- Cambios en la tensión parcial de oxígeno.

2. Sustancias vasoactivas:

- Acetilcolina.
- Difosfato de adenosina (ADP).
- Trifosfato de adenosina (ATP).
- Bradiquinina.
- Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (P.R.G.C.).
- Ionóforos del calcio (A23187).
- Colecistoquinina.
- Histamina.
- Noradrenalina.
- Serotonina.
- Sustancia P.
- Trombina.
- Péptido intestinal Vasoactivo (V.I.P.).
- Etcétera.

Así Sembowicz ⁽⁶⁴⁾ habla de la existencia de otro vasodilatador derivado del endotelio más potente y más estable que el óxido nítrico, que procedería de la reacción química entre el NO y la L-HO-Arginina, estudiado en cultivos de células endoteliales, por esta razón se está acuñando en la literatura el término de sustancias nitrovasodilatadoras endógenas dependientes de endotelio o de la vía L - arginina - óxido nítrico.

Palmer y col. en 1988 ⁽⁶⁵⁾, usando cultivos de células endoteliales de aorta de cerdo, demostraron que el óxido nítrico liberado de estas células proviene de la oxidación del átomo de nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina, la enzima citosólica necesaria para esta reacción es la óxido nítrico sintetasa constitutiva endotelial, que se activa por la interacción con el calcio y la calmodulina, y necesita como cofactores: NADPH, tetrahydrobiopterina, dinucleótido de flavina adenina, mononucleótido de flavina, glutathion reducido y el grupo hemo. Esta es la primera de las tres isoenzimas de óxido nítrico sintetasa que han sido descritas, la otra enzima también constitutiva se encuentra en el S.N.C., y se denomina óxido nítrico sintetasa constitutiva cerebral, y la tercera isoenzima es la óxido nítrico sintetasa inducible, presente en los macrófagos. (47,49,50,54,60,65, 66, 67,68)

También se ha comprobado que una serie de análogos de la L-arginina como: N^G-monometil-L-arginina (L - NMMA), N^G-nitro-L-arginina metil éster (L - NAME), N^G-nitro-L-arginina (L - NA), N^G-iminoethyl-L-ornitina (L - NIO), entre otros, inhiben competitivamente la síntesis de óxido nítrico, y que la adición al medio de L - arginina revierte

esta inhibición, volviendo a sintetizarse óxido nítrico. Todas estas sustancias están siendo de gran utilidad para poder estudiar la función del óxido nítrico en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Recientemente, se han descubierto una serie de sustancias endógenas inhibitoras de la síntesis de NO, liberadas por los leucocitos polimorfonucleares humanos, y también en situaciones de insuficiencia renal crónica, aún no bien identificadas ni clarificado su papel fisiopatológico. (69,70,71)

El mecanismo de transferencia del óxido nítrico hasta el endotelio se está cuestionando, probablemente no se libere directamente en forma de óxido nítrico propiamente dicho, sino de un compuesto más estable como puede ser la S-nitrosocisteína, el cual daría lugar, a nivel de la membrana celular a la formación de óxido nítrico. (62)

Los nitrovasodilatadores endógenos derivados de endotelio, entre los que se encuentra el óxido nítrico, atraviesan rápidamente la membrana del miocito y en su citosol se unen a la porción hemo de la enzima guanilato ciclasa soluble activándola; esta enzima convierte el trifosfato de guanosina (GTP) en monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), el incremento de GMPc en la fibra muscular lisa provoca una disminución de la disponibilidad de calcio citosólico, por varios posibles mecanismos, uno de ellos es la inhibición de la hidrólisis del fosfatidilinositol, lo que hace que se movilice calcio hacia el retículo sarcoplásmico, asimismo, concentraciones elevadas de GMPc, aumentan la captación de calcio del retículo

sarcoplásmico, disminuyen la sensibilidad de la cadena ligera de la miosina al calcio, activan la bomba de calcio de la membrana celular, sacando calcio del citosol, e interfieren con los canales de calcio receptor dependientes, y tienen como resultado final disminuir los niveles intracelulares de calcio. Sin embargo, las sustancias nitrovasodilatadoras endógenas derivadas de endotelio no sólo actúan en el miocito vascular, activando la producción de GMPc, sino que se están descubriendo otras acciones independientes de la activación de la guanilato ciclasa como, la inducción de una hiperpolarización transitoria de la membrana del miocito, mediante la estimulación directa de la bomba sodio - potasio y la activación directa de los canales de potasio calcio dependientes de la fibra lisa vascular. (50,54,60, 72,73)

El óxido nítrico producido es una molécula muy difusible e inestable con una vida media muy corta de 3 - 6 segundos en condiciones de bioensayo, y unos 30 segundos en cultivos celulares, se inactiva combinándose rápidamente con el oxígeno y con radicales libres de oxígeno, para formar NO_2 , NO^{2-} , y NO^{3-} ; también, presenta gran avidez para combinarse con el grupo hemo de la hemoglobina y formar metahemoglobina. (47,49,66,67)

Diversos estudios experimentales han demostrado que en condiciones basales existe tanto en animales como en el hombre, en los diferentes territorios vasculares arteriales y venosos, sistémico, pulmonar, y coronario, una síntesis continua de óxido nítrico, el cual produce un tono vasodilatador

basal responsable al menos en parte de la regulación endotelial del tono vascular, y por tanto de la presión arterial y del flujo sanguíneo que llega a los diferentes territorios corporales. (50,74)

Actualmente, se conocen multitud de factores endógenos y exógenos estimulantes de la síntesis de óxido nítrico. Los factores fisiológicos endógenos que se conocen hasta el momento son, por un lado, los cambios en la presión o tensión de la pared vascular, debidos a los cambios de flujo sanguíneo, denominados en la literatura anglosajona como *shear stress*, y por otro lado, están los cambios en la presión parcial de oxígeno. Así se ha comprobado como el incremento en el flujo sanguíneo, y en general, los incrementos en la presión o tensión ejercida sobre la paredes de las arterias, condiciona un estímulo importante para la producción de NO, por tanto el mecanismo de deformación de la membrana endotelial puede que represente un importante sensor de flujo, a través del cual los endoteliositos regulan el diámetro arterial. A su vez, también se ha demostrado que la síntesis de NO se ve interrumpida en condiciones de anoxia y de hipoxia crítica (PaO_2 inferior a 30 mmHg.), y es sustituida por la síntesis de factores vasoconstrictores, estos hallazgos sugieren que la producción de NO probablemente se interrumpa en condiciones de anaerobiosis. (54,74)

La acetilcolina activa los receptores endoteliales muscarínicos, los cuales estimulan la producción de NO en el endoteliosito, produciendo vasodilatación dependiente del endotelio, sin embargo la respuesta a la acetilcolina no es homogénea entre todos los territorios arteriales y varía de

unas especies animales a otras, así está descrito que la aplicación intracoronaria de una dosis alta de acetilcolina en mandriles sedados provoca vasoconstricción intensa. (66,75,76)

Las purinas (ADP y ATP) actúan sobre los receptores purinérgicos situados tanto en la membrana del endotelio como en la de la fibra lisa vascular. La activación del purinorreceptor de la membrana de endotelio (subtipo P_{2y}), produce vasodilatación mediante la estimulación de la vía L-arginina - óxido nítrico. Por el contrario, en la membrana de la fibra muscular lisa se encuentran dos subtipos de purinorreceptores (P_{2x} y P_{2y}), la estimulación preferente de los receptores P_{2y} provoca vasodilatación, sin embargo la estimulación de los receptores P_{2x} produce vasoconstricción, por tanto la respuesta global depende de la presencia o no de endotelio íntegro, que con la producción de NO de como respuesta vasodilatación. (60,66,77)

La importante hipotensión que provoca la administración intravenosa de histamina se produce por diferentes mecanismos: una gran disminución del tono vascular, una acción directa inotrópica negativa sobre el músculo cardíaco y un incremento de la permeabilidad capilar. En la membrana endotelial se sitúan receptores histaminérgicos tipo H_1 que al ser estimulados, activan la vía L - arginina - óxido nítrico produciendo vasodilatación. En la membrana de las fibras musculares lisas existen dos tipos de receptores histaminérgicos, los H_1 que provocan vasoconstricción y los tipo H_2 que favorecen la vasodilatación. La repuesta global a la histamina depende por tanto de la distribución de la población de receptores

entre los diferentes territorios vasculares, así como de la buena funcionalidad e integridad del endotelio. (54,60,66,78)

Sin duda alguna queda aún un largo y apasionante camino que recorrer hasta esclarecer mejor los diferentes mecanismos de actuación y regulación del endotelio sobre la actividad de la fibra muscular lisa, durante el cual muchos de los conocimientos dados como válidos hasta el momento serán rebatidos y sustituidos por otros nuevos.

3.2. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (E.D.H.F.)

Se ha identificado un factor hiperpolarizante producido por el endotelio tras ser éste estimulado con acetilcolina, este E.D.H.F. provoca cambios transitorios en el potencial de membrana de las fibras musculares lisas, así se ha comprobado que la estimulación con acetilcolina de segmentos de venas femorales de ratas, provoca relajación e hiperpolarización de la fibra muscular lisa, y si se mantiene la estimulación con acetilcolina, se mantiene el efecto relajante dependiente de sustancias nitrovasodilatadoras endógenas, sin embargo, la hiperpolarización de la membrana desaparece con el tiempo. Parece ser que la estimulación de los receptores muscarínicos M_1 provocaría la liberación de NO, mientras la estimulación de los receptores M_2 de la membrana del endotelio

provocaría la liberación del E.D.H.F., que produce relajación vascular mediante la activación de los canales de potasio, ATP sensibles, del miocito. La naturaleza química de este factor aún no se ha esclarecido con total seguridad. (61,79,80)

El NO y la prostaciclina son dos conocidos productos endoteliales que cumplen todas las características para poder ser considerados factores hiperpolarizantes derivados del endotelio. Así hay trabajos que demuestran que la prostaciclina provoca relajación vascular a través de la hiperpolarización de la membrana del miocito, al activar los canales de potasio en la circulación coronaria de conejos (81,82,83). También se ha demostrado que el NO hiperpolariza la membrana de los miocitos vasculares, en todos los territorios vasculares estudiados hasta el momento, a concentraciones superiores a 5×10^{-7} M. (83,84,85)

Sin embargo, existen más E.D.H.F. aparte del NO y de la prostaciclina, cuya naturaleza aún no se conoce con seguridad, entre estas diferentes sustancias se barajan como posibles, el peróxido de hidrógeno, productos no prostanoideos del metabolismo del ácido araquidónico o productos del citocromo P - 450. (83,86,87,88)

3.3. Factores contráctiles derivados del endotelio (E.D.C.F.)

Diversos trabajos han demostrado la existencia de factores vasoconstrictores producidos por el endotelio ante diferentes estímulos como cambios de presión, anoxia, estimulación eléctrica, dosis altas de acetilcolina, entre otros. Uno de estos E.D.C.F. ha sido identificado como un péptido de 21 aminoácidos, denominado endotelina (ET), que constituye una familia de tres isómeros (ET-1, ET-2 y ET-3), de ellos la ET-1 es el isómero principal en los seres humanos, y una de las sustancias vasoconstrictoras más potentes conocidas. La síntesis de este péptido está inducida por diferentes sustancias vasoactivas como la trombina, adrenalina angitensina II, vasopresina, T.G.F.-beta, y IL-1, entre otras muchas. (89,90)

Todavía no se conoce bien el papel que la endotelina juega en la regulación del tono vascular, ya que aunque se ha demostrado una síntesis basal de esta sustancia en cultivos celulares endoteliales, la mayoría de los autores están de acuerdo en reconocer que los niveles circulantes de endotelina no pueden provocar un tono vasoconstrictor sistémico, sin embargo creen que la endotelina juega un papel importante en la regulación de los mecanismos vasoconstrictores locales. (89,90,91,92)

La endotelina 1 procede de un precursor denominado pre-proendotelina 1, del que se forma la endotelina 1 grande, y por reacciones proteolíticas catalizadas por la enzima convertidora de la endotelina, se forma finalmente endotelina 1 activa, la cual se une al menos a dos tipos de

receptores: el subtipo A de receptor de la endotelina, que es muy selectivo para la endotelina 1, y se encuentra distribuido en la musculatura lisa vascular de arteriolas y vénulas, y es el responsable de producir la vasoconstricción. El subtipo B de receptor de la endotelina, tiene la misma afinidad por los tres tipos de endotelinas y se encuentra en los endotelios, su activación tiene un doble efecto por un lado provoca vasoconstricción, pero a la vez provoca vasodilatación por la estimulación de la liberación de NO y prostaciclina, modulando de esta forma la respuesta contráctil. (89,90,91,92,93,94)

La endotelina 1 está implicada en la patofisiología de numerosas enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva y la hipertensión pulmonar entre otras muchas. (89,90,91,92,93,94,95,96,97)

3.4. Metabolitos del ácido araquidónico

La producción de prostanoides está determinada, en primer lugar, por la movilización de ácido araquidónico de las membranas celulares mediante la fosfolipasa A₂. El ácido araquidónico es modificado por la sintasa de endoperóxidos de prostaglandinas, la cual posee una actividad

ciclooxigenasa sobre PGG_2 , y una actividad peroxidasa que produce la PGH_2 , que es el precursor de todos los prostanoides.

Los prostanoides vasodilatadores principales son la prostaciclina PGI_2 , y las prostaglandinas PGD_2 y la PGE_2 , todas ellas son producidas por el endotelio y liberadas hacia la fibra lisa vascular, donde produce relajación de la misma por activar la producción de AMP cíclico y bloquear los canales de calcio, disminuyendo la entrada del mismo. Por otro lado, tenemos los eicosanoides con acción vasoconstrictora, los principales son el tromboxano A_2 , los leucotrienos, y las prostaglandinas PGH_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$, que provocan vasoconstricción por acción directa sobre la membrana del miocito vascular al activar los canales de calcio.

La prostaciclina PGI_2 es la principal prostaglandina producida por el endotelio en condiciones normales, sin embargo en algunos lechos vasculares la síntesis de PGD_2 o de PGE_2 predomina sobre la síntesis de PGI_2 , y en determinadas situaciones patológicas como en ratas diabéticas, hipertensas o con hipercolesterolemia, se ha demostrado que predomina la producción de eicosanoides vasoconstrictores, fundamentalmente PGH_2 , tromboxano A_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$. (49,75,81,85,98,99)

3.5. Agregación plaquetaria y tono vascular

Las células endoteliales están implicadas en el balance entre agregación plaquetaria, coagulación, formación del trombo y fibrinólisis, y a su vez las sustancias liberadas durante la agregación plaquetaria tienen una acción muy importante en la regulación del tono vascular.

Así la liberación de serotonina, procedente de las plaquetas agregadas, provoca vasodilatación endotelio - dependiente, por la estimulación de los receptores serotoninérgicos (S_1) de la membrana de los endotelios, que liberan NO, sin embargo esta respuesta vascular exige la integridad anatómica y funcional del endotelio, ya que si se pierde el endotelio, la serotonina provoca una intensa vasoconstricción por estimulación de los receptores serotoninérgicos (S_2) que se encuentran en la superficie de los miocitos lisos vasculares. (47,49)

La liberación del factor activador de plaquetas (P.A.F.) por parte de plaquetas, neutrófilos, células cebadas y endotelios, provoca una vasodilatación endotelio - dependiente sólo a concentraciones elevadas. La acción vasomotora del P.A.F. es muy compleja ya que no sólo estimula la liberación de NO, sino que también la liberación de tromboxano A_2 y leucotrienos, por tanto la acción vascular neta final del P.A.F. es muy variable. Otra sustancia vasoactiva liberada al producirse la agregación plaquetaria es el tromboxano A_2 , que tiene un potente efecto vasoconstrictor endotelio independiente sobre los miocitos vasculares.

La trombina formada durante la cascada de la coagulación, produce una relajación endotelio dependiente por estimulación de la producción de NO en los diferentes territorios vasculares incluido la circulación coronaria.

La liberación de ADP y ATP de las plaquetas produce estimulación de los receptores purinérgicos endoteliales, que como ya se ha comentado anteriormente provocan liberación de NO endotelial, y vasodilatación endotelio dependiente, pero a su vez estimula los receptores purinérgicos de los miocitos vasculares produciendo vasoconstricción en los territorios vasculares desprovistos de endotelio. (47,49,60)

En general, las sustancias vasoactivas liberadas por las plaquetas agregadas tienen efectos opuestos dependiendo de la presencia íntegra o no del endotelio. En condiciones normales, con un endotelio funcionando, predomina las acciones vasodilatadoras sobre las vasoconstrictoras, sin embargo cuando el endotelio se destruye o no es funcionando, se produce ante la liberación local de estas sustancias, una intensa respuesta vasoconstrictora. (60,67,100,101,102,103)

3.6. Péptidos vasoactivos

Los miocitos auriculares de los mamíferos poseen la capacidad de producir y liberar una serie de péptidos, con propiedades natriuréticas, vasodilatadoras e inhibidoras de la aldosterona, denominados péptidos natriuréticos auriculares (P.N.A.), cuya función principal es participar en el control del volumen venoso central. Estos péptidos son liberados ante incrementos en la presión auricular.

Los péptidos natriuréticos auriculares provocan vasodilatación en los territorios arteriales pulmonares, aórticos, carotídeo y renal, pero no tienen efectos sobre los territorios coronario, mesentéricos y femorales. Esta vasodilatación se debe a un incremento de los niveles de GMPc tanto en el endotelio como en el miocito, por un mecanismo NO independiente, a través de la activación de la guanosina ciclasa particulada. Sin embargo, se ha podido demostrar que existe una relación entre el NO y los P.N.A., ya que la producción de NO es capaz de inhibir la liberación de los P.N.A.^(60,104)

Por el contrario, existen una serie de péptidos con potentes efectos vasodilatadores, como son la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el péptido intestinal vasoactivo, cuya acción vasodilatadora está mediada por la producción de NO endotelial.^(60,67,105,106)

3.7. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

El tono vascular depende del grado de contracción de las miofibrillas de los miocitos lisos vasculares, que depende directamente de la biodisponibilidad intracelular de calcio. Los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc provocan relajación de las fibras musculares lisas al inhibir la entrada de calcio por los canales de calcio voltaje dependiente, y por facilitar la recaptación de calcio hacia el retículo sarcoplásmico. A su vez, el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (E.D.H.F.) provoca vasodilatación ya que impide la despolarización de la membrana del miocito, al inhibir la activación de canales de calcio voltaje dependientes. Por el contrario, el conjunto de sustancias vasoconstrictoras activan los canales de calcio y provocan un incremento del calcio citosólico, al facilitar la entrada de calcio al interior de la célula y la liberación de los depósitos de calcio intracelulares.

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos son las principales responsables de la regulación de las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc, al ser las responsables de su degradación. Se han aislado multitud de isoenzimas (más de veinte) de diferentes tejidos y la primera clasificación realizada por Beavo y Reifsnyder, se basa en la especificidad del sustrato sobre el que actúan, su modulación por calmodulina o por GMPc, su secuencia primaria y su respuesta farmacológica a diferentes inhibidores. Según estas características las PDE han sido clasificadas en cinco familias de isoenzimas, denominadas grupo I, II, III, IV y V. El

conocimiento de su distribución en los diferentes tejidos del organismo y la multitud de acciones fisiológicas en las que están implicadas están siendo descritas en los últimos años. (Tabla II) ^(107,108)

La familia I de fosfodiesterasas presenta siete subtipos de isoenzimas, todas ellas se caracterizan por necesitar para su actuación la presencia de calcio y calmodulina. Se han identificado en corazón, músculo liso vascular, cerebro y pulmón, su sustrato principal es la hidrólisis de GMPc y su actividad no se ve influenciada por los niveles de GMPc. Los inhibidores de fosfodiesterasas que más actúan sobre esta familia son: la nicardipina, la nifedipina, el vinpocetina, las metilxantinas y las fenotiacinas.

La familia II o fosfodiesterasas GMPc estimuladas presentan tres subtipos de isoenzimas, se han identificado en corazón, sistema nervioso central, corteza adrenal, y en los últimos años también en músculo liso vascular, hidrolizan tanto GMPc como AMPc, y la actividad hidrolítica sobre AMPc se ve estimulada por la presencia de GMPc. Los inhibidores de fosfodiesterasas que más actúan sobre esta familia son el dipiridamol y la papaverina, no habiéndose identificado hasta el momento inhibidores selectivos de este grupo.

La familia III o fosfodiesterasas GMPc inhibidas tienen tres subtipos de isoenzimas; se han aislado de corazón, músculo liso vascular,

TABLA II. Clasificación de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.

Grupo I o familia Ca²⁺ - calmodulina dependiente:

Principalmente hidrolizan GMPc.

Necesitan Ca²⁺ - calmodulina para actuar.

Grupo II o familia GMPc estimulada:

Hidrolizan GMPc y AMPc.

La hidrólisis de AMPc es estimulada por GMPc.

Grupo III o familia GMPc inhibida:

Principalmente hidrolizan AMPc.

La hidrólisis de AMPc es inhibida por GMPc.

Grupo IV o familia AMPc específica:

Hidrolizan AMPc.

No se modifican por GMPc.

Grupo V o familia GMPc específica:

Hidrolizan GMPc.

No se modifican por la presencia de Ca²⁺ - calmodulina.

plaquetas, adipocitos e hígado, hidrolizan preferentemente AMPc, y la actividad hidrolítica se ve inhibida por GMPc. Existen varios inhibidores selectivos de este grupo de fosfodiesterasas como son: la amrinona, la milrinona, la enoximona, la piroximona, la cilostamida, el imazodan, el SKF - 94120, la trequinsina, la quazinona, el indolidan, el anagrelide, entre otras sustancias en estudio. La característica principal de todas estas sustancias es que al incrementar los niveles de AMPc en el corazón desarrollan una acción inotrópica positiva.

La familia IV o fosfodiesterasas AMPc específicas tienen ocho subtipos de isoenzimas identificadas hasta el momento. Se han aislado del sistema nervioso central, sistema reproductor, músculo liso vascular, riñones y linfocitos, hidrolizan específicamente AMPc y la actividad hidrolítica se ve inhibida por GMPc sólo a concentraciones altas. Los inhibidores de fosfodiesterasas más activos sobre este grupo son el rolipram y el Ro - 201724.

La familia tipo V o fosfodiesterasas GMPc específicas presentan cuatro isoenzimas conocidas; se han aislado de retina, músculo liso vascular, plaquetas y pulmones, e hidrolizan específicamente GMPc. Los inhibidores de fosfodiesterasas selectivos sobre este grupo son el zaprinast y el dipiridamol.

Existen descritos muchos inhibidores de fosfodiesterasas, con características físico - químicas muy diversas, la mayoría de ellos son

capaces de inhibir los diferentes tipos de fosfodiesterasas, sólo que a dosis inhibitorias 50 (I.D.₅₀) diferentes, así se habla de inhibidor selectivo de un grupo de fosfodiesterasas si la I.D.₅₀ de ese fármaco para ese grupo es muy pequeña (próxima a 1 microM o menor) y para el resto de grupos es alta; y de inhibidores inespecíficos de fosfodiesterasas cuando presentan I.D.₅₀ muy similares para los diferentes grupos de fosfodiesterasas.(Tabla III) (107, 108,109,110)

TABLA III. Principales Inhibidores de fosfodiesterasas.

A) No selectivos o comunes:

Papaverina.

Teofilina.

3-isobutyl-1-metilxantina.

B) Selectivos de grupo:**Grupo I o familia Ca-calmodulina dependiente**

Vinpocetina.

Fenotiacinas.

Grupo II o familia GMPc estimulada

No conocidos.

Grupo III o familia GMPc inhibida

Amrinona, Milrinona, Enoximona, Piroximona, Cilostamida,

Imazodan, Trequinsina, Quazinone, Carbazeran, etc...

Grupo IV o familia AMPc específica

Rolipram y RO201724.

Grupo V o familia GMPc específica

Dipiridamol.

Zaprinast.

3.8. Nervios perivasculares

Los nervios perivasculares forman en la adventicia y media de la mayoría de los vasos sanguíneos un gran entramado de fibras nerviosas terminales. Estos axones terminales están desprovistos de mielina y son muy ricos en varicosidades (1 - 2 μm de diámetro), separadas por las regiones intervaricosas (0,1 - 0,3 μm de diámetro). Las varicosidades son los principales lugares de almacenamiento de neurotransmisores, que se liberan en forma de pulsos al despolarizarse las terminaciones nerviosas, para activar las fibras lisas vasculares en continuidad eléctrica a través de las uniones gap.

Las varicosidades no están unidas físicamente a cada miocito, sino que existe una hendidura de separación que varía entre 60 - 2000 nm, existiendo una relación entre el diámetro del vaso y el tamaño de la hendidura, así las hendiduras más grandes están en los vasos de mayor calibre. El miocito liso vascular, en la unión neuromuscular, carece de estructuras especializadas como ocurre en la placa motora del músculo estriado. Así pues, se producen modificaciones del proceso clásico de neurotransmisión, realizándose en estas terminaciones neuromusculares a través de la acción de los **neuromoduladores**. Los neuromoduladores pueden ser desde hormonas circulantes, sustancias con acción local como prostanoïdes, kininas o histamina, hasta los propios neurotransmisores liberados desde la misma varicosidad o incluso de varicosidades de terminaciones nerviosas adyacentes. (111,112)

Durante más de cincuenta años, los únicos neurotransmisores de los nervios perivasculares reconocidos fueron la noradrenalina y la acetilcolina. En la década de los sesenta, se descubrieron las terminaciones nerviosas perivasculares no adrenérgicas no colinérgicas, desde entonces más de 18 nuevos mensajeros químicos han sido identificados, incluyendo entre ellos monoaminas, purinas, aminoácidos, polipéptidos y el mismo óxido nítrico.(Tabla IV)⁽¹¹¹⁾

Hoy día se acepta unánimemente el concepto de **cotransmisión**, propuesto por Burnstock en 1976 ⁽¹¹²⁾, por el cual, las terminaciones nerviosas pueden sintetizar, almacenar y liberar más de un tipo de transmisor y se comprueba que es un fenómeno muy extendido, incluyendo la transmisión nerviosa de nervios perivasculares. En lugar de la complejidad derivada de la creciente lista de nuevos transmisores y el número de combinaciones posibles de cotransmisión que se derivan, están apareciendo modelos que indican un considerable grado de organización dentro del sistema nervioso autónomo. Estos estudios nos llevan a pensar que los nervios autónomos tienen un código químico, por el cual cada neurona tiene una combinación particular de sustancias transmisoras, con proyecciones a determinados lugares diana y conexiones centrales definidas, estos conceptos se desarrollaron en el estudio del sistema nervioso entérico, pero también son aplicables a los nervios perivasculares.^(111,112,113,114)

TABLA IV. Principales neuromoduladores en nervios perivasculares.

Noradrenalina.

Acetilcolina.

Trifosfato de adenosina (ATP).

5 - Hidroxitriptamina (5 - HT).

Dopamina.

Encefalina - dinorfina.

Péptido intestinal vasoactivo.

Sustancia P.

Péptido liberador de gastrina.

Somastostatina.

Neurotensina.

Vasopresina.

Gastrina - colecistoquinina.

Galanina.

Péptido pancreático - neuropéptido Y.

Angiotensina.

Hormona adrenocorticotrófica.

Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

Óxido nítrico.

Dentro de los nervios perivasculares podemos distinguir: los pertenecientes al sistema nervioso autónomo, simpáticos y parasimpáticos; y las terminaciones nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas entre las que se identifican los sensitivo - motores y nervios perivasculares que nacen de neuronas intramurales. Las terminaciones nerviosas simpáticas liberan como cotransmisores la noradrenalina (NA) y el trifosfato de adenosina (ATP), en proporciones y cantidades muy variables, dependiendo del tipo de vaso, intensidad y duración del estímulo y la especie animal, entre otros factores. También hay estudios que afirman que el neuropéptido Y, la dinorfina, y la 5-Hidroxitriptamina, son almacenados y liberados de las terminaciones nerviosas simpáticas como cotransmisores de la NA, para conseguir tras su liberación la activación de las fibras lisas vasculares produciendo vasoconstricción. (115)

Las terminaciones nerviosas parasimpáticas presentan como transmisor principal la acetilcolina, y como cotransmisores en determinados tejidos se ha demostrado la presencia del péptido intestinal vasoactivo, el neuropéptido Y, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el óxido nítrico. Estas terminaciones nerviosas presentan acciones opuestas a las terminaciones simpáticas, habiéndose demostrado potentes efectos vasodilatadores para todos estos cotransmisores parasimpáticos. (116)

Los nervios perivasculares sensitivo - motores han sido estudiados recientemente, identificándose como principales cotransmisores; la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, el ATP y

otras sustancias químicas en estudio que producirían una potente vasodilatación. Estos nervios primarios sensitivos aferentes estarían distribuidos por el corazón, grandes vasos arteriales y venosos, y pequeños lechos vasculares, llevando la información al sistema nervioso central, el cual respondería con una función eferente por esas mismas terminaciones nerviosas en el órgano diana, completando el arco reflejo axonal. (117)

También se han aislado neuronas en la propia pared de los vasos y del corazón, que dan posteriormente lugar a nervios perivasculares. Estudios sobre neuronas de aurículas de cerdos han demostrado la presencia de cotransmisores como 5-HT y el neuropéptido Y, que producirían vasoconstricción de las arterias coronarias (118). Por otro lado, se han identificado neuronas intrínsecas de la pared vascular de otros órganos en las que el transmisor es el óxido nítrico, cuya liberación produce vasodilatación en esos territorios vasculares. (111,119)

4. Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca se define como el estado fisiopatológico en el cual, debido a una anomalía de la función cardíaca, el corazón no impulsa la sangre necesaria para los requerimientos metabólicos de los tejidos

periféricos, o lo hace únicamente mediante la elevación de la presión de llenado de los ventrículos. (1,2,120)

Aunque el fallo cardíaco es una situación fisiopatológica compleja que afecta a todos los órganos de nuestro cuerpo, nos vamos a detener fundamentalmente, en los cambios que se producen en el corazón y en las circulaciones sistémica y pulmonar.

4.1. Repercusiones en la circulación sistémica y pulmonar

La alteración inicial que desencadena todo el síndrome de insuficiencia cardíaca es la incapacidad progresiva de los miocitos cardíacos para relajarse con la suficiente prontitud durante la diástole, junto con la incapacidad para contraerse con la suficiente fuerza para expulsar todo el retorno venoso que le llega. La segunda consecuencia es un incremento de las presiones de llenado de los ventrículos, con un enlentecimiento en el llenado ventricular. Todos estos factores provocan un aumento de la tensión de la pared ventricular, con el consiguiente aumento del consumo de oxígeno miocárdico, reduciéndose finalmente el gasto cardíaco. (1,2,3,4,5, 6,120,121,122)

La reducción del gasto cardíaco pone en marcha una serie de reflejos neuroendocrinos complejos, que interaccionan entre sí, para aumentar la

presión de llenado de los ventrículos. Los principales sistemas que se activan son: el sistema simpático adrenérgico, con liberación de catecolaminas endógenas principalmente noradrenalina, con lo que se produce vasoconstricción arterial y venosa. El otro sistema que se activa es el de la renina - angiotensina - aldosterona, que a través de la angiotensina II produce también vasoconstricción y a través de la aldosterona retención de agua y sodio. (1,2,3,4,5,6,7,8,120,122,123)

Las consecuencias de esta actividad neuroendocrina sobre el sistema vascular son: un incremento de las presiones de llenado de ambos ventrículos, de las resistencias vasculares sistémicas y pulmonares, y del contenido total de agua y sodio, con un descenso progresivo de la distensibilidad vascular. Todos estos cambios vasculares ocasionan en el territorio sistémico una redistribución del gasto cardíaco, desviándose principalmente hacia áreas metabólicamente vitales, a expensas de un descenso en el aporte de sangre en el resto del organismo. (120,121,122,123,124,125)

En la circulación pulmonar el fallo cardíaco provoca un incremento en la presión y el volumen de las venas pulmonares, un aumento del agua pulmonar total y un edema de la mucosa bronquial que originan alteraciones de la relación ventilación - perfusión. Todos estos cambios fisiopatológicos dan como resultado una pérdida de la elasticidad pulmonar y una rigidez progresiva de los vasos arteriales y venosos pulmonares, estableciéndose una situación de hipertensión pulmonar.

La hipertensión pulmonar es el factor pronóstico más importante en la evolución natural de la insuficiencia cardíaca. Tanto es así que es el factor más temido por el anestesiólogo - reanimador en el manejo perioperatorio de los síndromes de bajo gasto, ya que conseguir superar una mala contractilidad miocárdica resulta relativamente asequible con los potentes fármacos inotrópicos positivos de los que disponemos, sin embargo, conseguir controlar una hipertensión pulmonar establecida, resulta un problema verdaderamente difícil de solucionar y acaba siendo el factor que condiciona una mala evolución postoperatoria en la mayoría de las ocasiones. (120,121,122,123,124,125,126,127)

Los objetivos principales en el tratamiento general de la insuficiencia cardíaca son: en primer lugar, la restauración del contenido corporal total de agua y sal a los límites normales, la disminución del trabajo ventricular, reduciendo las resistencias vasculares pulmonares y sistémicas, mejorar la contractilidad y la relajación diastólica del miocardio, y por último, conseguir estos objetivos sin aumentar, o incluso disminuir el consumo de oxígeno miocárdico. Así en el tratamiento crónico de la insuficiencia cardíaca debemos considerar todos estos aspectos ajustando periódicamente, el tratamiento médico, con los fármacos diuréticos y vasodilatadores disponibles por vía oral. (128,129)

Sin embargo, los estados de insuficiencia cardíaca aguda en los que los síntomas y signos de disminución del gasto cardíaco, se producen en pocas horas o minutos, requieren un enfoque clínico y sobre todo

terapéutico diferente. La insuficiencia cardíaca aguda puede presentarse en una persona con función cardíaca previamente normal, lo que supone el desarrollo repentino de una anomalía anatómica o funcional grave del corazón, de sus válvulas, de su vascularización o de su ritmo. Sin embargo, un cuadro de insuficiencia cardíaca aguda también puede desarrollarse en un paciente afecto de insuficiencia cardíaca crónica que se ha mantenido relativamente estable mediante un régimen de medicación y adaptación a un estilo de vida, y que en un momento dado experimenta una descompensación brusca. (120)

Otra situación de insuficiencia cardíaca aguda, con la que frecuentemente se enfrenta el anestesiólogo es el síndrome de bajo gasto cardíaco perioperatorio, situación casi constante en la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea y en la cirugía vascular de grandes vasos. Sin embargo, no es infrecuente ver este cuadro de insuficiencia cardíaca perioperatoria en pacientes con distintos grados de insuficiencia cardíaca crónica compensada, sometidos a cirugía no cardiovascular, y que entran en fallo cardíaco agudo, durante la intervención o en el periodo postoperatorio inmediato. (123,124,125)

Todas estas situaciones de insuficiencia cardíaca aguda requieren en primer lugar una intervención terapéutica urgente, para mejorar la función cardiovascular, con un soporte vital avanzado en Unidades de Reanimación Postquirúrgicas, donde se solucionará en primer lugar la causa del fracaso

cardíaco, si esto es posible, y mientras tanto se le administrará un soporte hemodinámico con fármacos inotrópicos y vasodilatadores. (120,123,124,125)

5. Fármacos inotrópicos positivos

5.1. Digitálicos

Químicamente constan de dos componentes: la genina o aglicona, constituida por un núcleo esteroideo unido a una lactona, y uno o varios azúcares. La fracción cardiotónica es la genina, mientras que los azúcares determinan la potencia y la duración de su acción.

El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en inhibir las bombas de sodio - potasio de las membranas celulares de los miocitos cardíacos, con lo que aumenta el sodio intracelular, lo que activa la bomba de sodio - calcio indirectamente, y por consiguiente aumenta la disponibilidad de calcio intracelular, con lo que se consigue un efecto inotrópico positivo. Los efectos electrofisiológicos de los digitálicos son en parte directos, y en parte porque tienen acción vagal. Así, sobre el nodo sinusal disminuye la pendiente de despolarización diastólica (fase 4), con lo que disminuye la frecuencia de descarga del mismo; sobre el nodo

aurículoventricular aumenta el periodo refractario del mismo y disminuye su velocidad de conducción. Los glucósidos cardíacos también tienen una acción directa sobre el músculo liso vascular arterial y venoso, con elevación del tono venoso y de las resistencias vasculares sistémicas.

La utilización de los digitálicos en situaciones de insuficiencia cardíaca severa o aguda no tiene justificación, ya que el comienzo de acción es prolongado, su vida media muy larga y errática según el gasto cardíaco, con un estrecho margen terapéutico y escasa potencia inotrópica positiva, estando indicada para el tratamiento crónico de insuficiencias cardíacas leves o moderadas, y aún así, en estas situaciones, hay autores que los desaconsejan, por la mayor incidencia de mortalidad demostrada con estos fármacos. Sí está indicado su uso en la fibrilación y flutter auriculares para disminuir la respuesta ventricular y controlar así la frecuencia cardíaca. (130, 131,132,133)

5.2. Fármacos inotrópicos simpaticomiméticos

La acción de cualquier catecolamina depende de su acción dominante sobre los distintos receptores adrenérgicos, y en la mayoría de las ocasiones esta acción depende de la dosis, así una misma catecolamina a distintas dosis tiene distintos efectos hemodinámicos.

Los receptores adrenérgicos se encuentran situados en la superficie de las membranas de un gran número de células de nuestro organismo. Nos interesa destacar desde el punto de vista hemodinámico los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos, los receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos y los receptores dopaminérgicos.

Los receptores β_1 adrenérgicos son los más numerosos en el corazón, situados sobre las estructuras nodales y los miocitos. La activación de estos receptores se efectúa a través de la proteína G estimuladora, activadora de la adenil ciclasa, transformando el ATP en AMPc. El AMPc, a su vez, activa las proteín-kinasas que producen diferentes fenómenos: por un lado, la fosforilación de los canales de calcio voltaje dependientes, aumentando la disponibilidad intracelular de calcio sin cambiar sus características electrofisiológicas; también inducen una activación de la glucogenolisis, lo que conduce a la obtención del ATP suficiente para mejorar la respuesta contráctil; e inducen la fosforilación del fosfolambano que activa la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico, que extrae calcio del citosol, lo que produce una relajación más rápida de los miocitos. El resultado final es un aumento del cronotropismo y del inotropismo miocárdico.

Los receptores β_2 adrenérgicos se encuentran situados principalmente: en la fibra muscular lisa bronquial, donde su activación provoca broncodilatación; en la fibra lisa vascular donde produce vasodilatación y en menor medida en los miocitos nodales cardíacos donde ejercen un efecto cronotrópico positivo.

Los receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos se localizan en el miocardio y sobre todo en la fibra lisa vascular. La activación de estos receptores, mediante la proteína G, estimula la fosfolipasa C, capaz de producir inositol - trifosfato, y diacil - glicerol, los cuales provocan la salida de calcio hacia el citosol, induciendo la contracción de la fibra lisa vascular, lo que conlleva un efecto vasoconstrictor predominante y un pequeño efecto inotrópico positivo que no contribuye al mantenimiento de la contractilidad miocárdica de forma habitual.

Los receptores dopaminérgicos subdivididos en dos poblaciones los DA_1 y los DA_2 , se encuentran distribuidos principalmente en el lecho vascular arterial mesentérico y renal, y en menor medida en el coronario y el cerebral, y su estimulación promueve la vasodilatación de estos territorios.^(134,135,136,137,138,139)

5.2.1. Dopamina

La dopamina es una catecolamina endógena precursora de la noradrenalina, agonista de los receptores dopaminérgicos (DA_1 y DA_2) y de los receptores alfa y beta adrenérgicos, sus efectos son dependientes de la dosis, así hasta 5 microgr/kg/min. predominan los efectos sobre los receptores dopaminérgicos y β - adrenérgicos, provocando vasodilatación

sobre todo de los territorios vasculares coronarios, renales, mesentéricos y un efecto inotrópico positivo. Por el contrario, dosis superiores a 10 microgr/kg/min. hacen que predominen las acciones sobre los receptores alfa adrenérgicos, con lo que la acción principal es la vasoconstricción.

Los efectos que una determinada dosis de dopamina tiene sobre una persona varían mucho según la edad y el estado fisiopatológico de su organismo, ya que determinan el número y sensibilidad de la población de receptores adrenérgicos, así se ha comprobado en recién nacidos prematuros que dosis inferiores a 10 $\mu\text{gr} / \text{kg} / \text{min}$ no poseen efectos inotrópicos y son ineficaces, debido a la inmadurez de los receptores.

Las principales desventajas de la dopamina a dosis inotrópicas elevadas son la taquicardia excesiva, una mayor arritmogenicidad y un aumento en el consumo miocárdico de oxígeno. (140,141,142,143,144)

5.2.2. Dobutamina

La dobutamina es una catecolamina sintética resultado de la modificación del isoproterenol. Su efecto inotrópico positivo se debe a la estimulación directa de los receptores β_1 adrenérgicos del miocardio, con lo que aumenta el gasto cardíaco. Dosis superiores a 15 - 20 $\mu\text{gr} / \text{kg} / \text{min}$

poseen efectos cronotrópicos positivos y vasodilatadores moderados por estimulación de los receptores β_2 .

La dobutamina es uno de los inotrópicos positivos más potentes con escasos efectos arritmogénicos que afecta poco a la frecuencia cardíaca y a las resistencias vasculares, por eso es uno de los fármacos más empleados en el tratamiento de los estados de insuficiencia cardíaca aguda.

Los principales problemas de la dobutamina son que aumenta el consumo de oxígeno miocárdico que puede llegar a incrementarse en un 30% a dosis terapéuticas, con lo que el empleo de la dobutamina en pacientes con mala reserva funcional coronaria puede ser perjudicial; y que presenta rápidamente fenómeno de taquifilaxia, así se ha demostrado una desensibilización de los receptores β a partir de las ocho horas tras el tratamiento en perfusión continua de dobutamina.

Además hay trabajos que demuestran que la dobutamina inhibe la vasoconstricción pulmonar hipóxica, por lo que no es un fármaco muy aconsejable para usar en situaciones de fallo ventricular predominantemente derecho, como ocurre en las situaciones de: hipertensión pulmonar primaria o secundaria, *cor pulmonale*, o en multitud de cardiopatías congénitas con disfunción principal del ventrículo derecho (T. de Fallot, hipoplasia de ventrículo derecho, estenosis pulmonares, etc...).(145,146,147,148,149)

5.2.3 Adrenalina

La adrenalina es una catecolamina endógena que estimula tanto los receptores alfa como los beta adrenérgicos de forma equilibrada. A dosis muy bajas (menores de 0,075 $\mu\text{gr} / \text{kg} / \text{min}$) predomina la estimulación β_2 sobre la estimulación alfa, que conlleva una disminución de resistencias vasculares periféricas, sin embargo a dosis mayores predomina la estimulación sobre los receptores alfa y por tanto un efecto vasoconstrictor intenso.

Sus indicaciones principales son: el tratamiento de la parada cardiocirculatoria y del *shock* anafiláctico. También ha sido utilizada durante muchos años como agente inotrópico positivo de primera línea en los estados de bajo gasto cardíaco, hoy se reserva su uso a los estados refractarios al tratamiento con dobutamina, que presenta menos efectos secundarios que la adrenalina. (150,151,152,153,154)

5.2.4. Noradrenalina

Esta catecolamina endógena estimula principalmente los receptores alfa y en menor intensidad los receptores β_1 , con escasos efectos sobre los receptores β_2 . Por tanto, la acción principal de esta catecolamina es

preservar la presión de perfusión tisular de los órganos vitales, al incrementar las resistencias vasculares periféricas, junto con una moderada acción inotrópica positiva.

Su principal indicación son los estados de circulación hiperdinámica con bajas resistencias periféricas, como es el caso del *shock* séptico, donde existe un gasto cardíaco elevado, pero no suficiente como para mantener una presión de perfusión tisular adecuada, debido a un estado de vasodilatación periférica intensa. (155,156,157,158)

5.2.5. Otros simpaticomiméticos con efecto vasoconstrictor

Existen otras catecolaminas con efectos predominantemente vasoconstrictores por estimulación α_1 , como son la **metoxamina** y la **fenilefrina**. Los vasoconstrictores se utilizan para restablecer la presión arterial y preservar fundamentalmente la presión de perfusión coronaria, sin embargo, no hay que olvidar que su uso no está exento de importantes complicaciones como son: el aumento brusco del retorno venoso, y de la postcarga, favoreciendo el edema pulmonar y la disminución del gasto cardíaco; además se puede producir la hipoperfusión de muchos tejidos que entrarán en metabolismo anaerobio; y su utilización prolongada reduce considerablemente la capacitancia del sistema vascular, con lo cual la

aparición de hipovolemia puede ser paralela a la supresión de los vasoconstrictores. (159,160,161,162,163,164)

5.2.6. Simpaticomiméticos con efectos predominantemente vasodilatadores

Dentro de este grupo podemos hablar del **isoproterenol** o **isoprenalina**, que es una catecolamina sintética, con marcado efecto β_1 y β_2 , por tanto con efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos, broncodilatador, y vasodilatador pulmonar y sistémico.

Sus indicaciones principales son: el tratamiento de soporte de las bradiarritmias sintomáticas, fundamentalmente en las alteraciones de la conducción aurículo - ventricular y en el trasplante cardíaco; y el tratamiento de la hipertensión pulmonar leve o moderada.

Por el contrario, los efectos beneficiosos sobre la hipertensión pulmonar se ven contrapuestos a su gran tendencia a producir taquiarritmias que hace que su uso se vea limitado a dosis bajas que no incrementen en exceso la frecuencia cardíaca. Otro problema que presenta este fármaco es que aumenta el consumo miocárdico de oxígeno, demostrándose que su empleo en el infarto agudo de miocardio incrementa el área isquémica y el

tamaño definitivo del infarto, por lo que su uso en estas situaciones está contraindicado. (165,166,167,168)

La **Dopexamina** es una nueva catecolamina sintética con potentes efectos sobre los receptores β_2 , y que también activa los receptores dopaminérgicos. Sobre los receptores β_1 sólo posee una pequeña acción indirecta, a través de la inhibición de la recaptación neuronal de catecolaminas endógenas, y no posee efectos sobre los receptores alfa.

Sus principal acción es producir vasodilatación tanto en el territorio sistémico como en el pulmonar, disminuyendo así la postcarga de los ventrículos, lo que incrementa el gasto cardíaco de forma indirecta. También mejora la perfusión de riñones, intestino, corazón y cerebro, sin producir grandes incrementos en la frecuencia cardíaca.

El principal problema de este fármaco es que su efecto inotrópico positivo es muy débil, y su uso se ve limitado a los síndromes de bajo gasto cardíaco con buenas presiones arteriales y con resistencias vasculares elevadas, es decir la indicación de los vasodilatadores. Sin embargo, es un fármaco de reciente introducción en la clínica y habrá que esperar el resultado de los estudios que se están realizando para conocer mejor sus características terapéuticas. (169,170,171,172,173,174)

5.3. Inhibidores del grupo III de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Se han identificado numerosas formas moleculares de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos que se encuentran ampliamente distribuidas en multitud de células de nuestro organismo (miocitos cardíacos, fibra lisa vascular y bronquial, plaquetas, hepatocitos, órganos sexuales, etc...), no habiéndose establecido aún cuantas isoenzimas existen en el hombre y su localización exacta. (107)

Beavo y colaboradores (107) han clasificado todo este grupo de enzimas en cinco grupos principales, en función de una serie de características como ya se vió con anterioridad. El grupo III de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos reúnen una serie de características comunes, como son: encontrarse distribuidas principalmente en los miocitos cardíacos, miocitos lisos vasculares y bronquiales, plaquetas y hepatocitos; el sustrato específico de este grupo de enzimas es el AMPc, al cual degradan en un producto inactivo que es el 5' monofosfato de adenosina, disminuyendo así los niveles intracelulares de AMPc. No dependen para actuar de calcio ni de calmodulina; y son inhibidas por GMPc. (107,109)

Dentro de las sustancias inhibidoras de las PDE del grupo III podemos distinguir dos grandes grupos; los inhibidores no selectivos, como son la papaverina, la teofilina y las metilxantinas, que inhiben los cinco grupos de enzimas PDE sin especial sensibilidad por ninguno de estos; y los

inhibidores selectivos del grupo III, dentro de los cuales cabe destacar clínicamente, del grupo de las biperidinas, la amrinona y la milrinona, y del grupo de los imidazoles, la enoximona y la piroximona. (109,110)

5.3.1. Inhibidores de PDE del grupo III biperidínicos

Amrinona

La amrinona fue el primer inhibidor selectivo de las PDE del grupo III que se empleó clínicamente. Con este fármaco empezaron a descubrirse una serie de nuevas propiedades y ventajas que aportan este grupo de fármacos frente a los simpaticomiméticos, en el tratamiento de los síndromes de bajo gasto cardíaco.

Así se comprobó que este fármaco produce un marcado incremento dosis dependiente del gasto cardíaco, con una reducción simultánea de las presiones de llenado y de la postcarga de ambos ventrículos, y con un efecto cronotrópico positivo leve. Todas estas características hacen que la amrinona tenga mejores resultados, en comparación a las catecolaminas, sobre el consumo de oxígeno miocárdico, sobre el fallo ventricular derecho

con presiones pulmonares elevadas y en los estados de regulación a la baja de los receptores simpaticomiméticos.

Por el contrario, una vida media prolongada y muy errática, al afectarse su metabolización hepática por el *status* acetilador, y otros muchos factores, una incidencia alta de trombocitopenia y ser un fármaco relativamente inestable y sensible a la luz, junto con una potencia inotrópica moderada, han hecho que se vea ampliamente superado por la milrinona.^(9,10,175,176,177,178,179,180)

Milrinona

Propiedades químicas

La fórmula química de la milrinona es 1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-(3,4'-biperidina)-5-carbonitrilo, su fórmula molecular es $C_{12}H_9N_3O$ y posee un peso molecular de 211,22 Kda.

La milrinona es muy soluble en medio ácido, poco soluble en metanol o etanol, y prácticamente insoluble en agua, cloroformo o soluciones básicas. La esterificación de la milrinona con el ácido láctico, mejora su hidrosolubilidad, pudiéndose conseguir la dispersión del lactato de

milrinona en medio acuoso, con un pH comprendido entre 3,2 y 4. (13,14, 15,16,20,21,181)

Mecanismos de acción

Los fármacos inotrópicos positivos actúan incrementando la disponibilidad de calcio citosólico para las proteínas contráctiles de los miocitos cardíacos, bien incrementando las corrientes de entrada de calcio extracelular, o bien aumentando los depósitos de calcio intracelular del retículo sarcoplásmico.

Cuando se estimulan los receptores β - adrenérgicos se activa la adenil ciclasa que convierte el ATP en AMPc, el cual actúa como segundo mensajero. Las corrientes de entrada de calcio al miocito cardíaco están moduladas por los niveles de AMPc intracelular, el cual activa las proteín-kinasas que fosforilizan las proteínas moduladoras de los canales de calcio tipo L (también denominados voltaje - dependientes), produciendo un aumento de la entrada de calcio al miocito, durante la meseta del potencial de acción. Una vez producido el AMPc, es rápidamente destruido en 5'-adenosín monofosfato inactivo, principalmente por la PDE del grupo III de nucleótidos cíclicos, aunque también por otro tipo de PDE. Por tanto, los

efectos inotrópicos positivos de la milrinona se deben a inhibir la degradación de AMPc intracelular y perpetuar así sus efectos. (22,23,24,25,26,27)

La relajación miocárdica se debe a la recaptación del calcio citosólico durante la diástole, realizada por las bombas de calcio del retículo sarcoplásmico con gasto de ATP; este proceso está mediado por el fosfolambano que se activa por el AMPc. Así, se ha podido comprobar como la milrinona acelera el proceso de relajación diastólica ventricular, al incrementar la disponibilidad intracelular de AMPc. (182,183,184,185,186,187,188,189, 190,191)

En la fibra lisa vascular el AMPc activa una proteína - kinasa AMPc dependiente, la cual activa las bombas de calcio del retículo sarcoplásmico, encargadas de la recaptación del calcio citosólico, y producir así la relajación de la fibra lisa vascular. Así pues, la milrinona posee efectos vasodilatadores directos sobre todos los territorios vasculares arteriales y venosos. (31,32,33,34,35,36,37,184,192)

La milrinona produce broncodilatación por relajación de la fibra lisa bronquial al incrementar los niveles intracelulares de AMPc, que de forma similar media en la recaptación del calcio citosólico por parte del sarcolema, disminuyendo la disponibilidad de calcio libre intracelular. (193,194)

La milrinona también inhibe la degradación de AMPc en las plaquetas, lo que modifica en estudios *in vitro*, los cambios de morfología y

agregación plaquetaria, y la síntesis de tromboxano A₂, lo que confiere a este fármaco una acción antiagregante en los estudios experimentales, no conociéndose bien su repercusión clínica real a las dosis utilizadas como inotrópico, existiendo algunos estudios clínicos que afirman que la milrinona no causa cambios importantes en el número o función plaquetaria. (195,196,197,198,199)

También se están estudiando los efectos de la milrinona sobre el sistema inmune, habiéndose demostrado que este fármaco es capaz de inhibir la liberación del factor de necrosis tumoral y de la interleukina I de macrófagos peritoneales de gato. (200,201,202,203)

Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos realizados con el lactato de milrinona en voluntarios sanos, y en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, muestran un modelo de distribución bicompartimental, sin embargo estudios recientes en pacientes tras cirugía cardíaca demuestran que un modelo tricompartmental se ajusta mejor al modelo farmacocinético de la milrinona. (32,33,34,35)

Tras la inyección de la dosis inicial del lactato de milrinona, se alcanzan concentraciones pico similares entre pacientes sanos y en insuficiencia cardíaca, siendo estas concentraciones séricas directamente proporcionales a la magnitud de la dosis inicial. Así cinco minutos después de la administración de una dosis de lactato de milrinona de 12,4 y 75 $\mu\text{gr} / \text{kg}$, en pacientes con insuficiencia cardíaca grado funcional II y IV de la clasificación de la N.Y.H.A., se obtuvieron concentraciones pico de 80 y 450 ng / ml , respectivamente. (32,33,34,35,36,37,204)

La curva dosis - respuesta que relaciona la concentración plasmática de la milrinona y el porcentaje de incremento del índice cardíaco es sigmoidea, con una concentración de la milrinona asociada al 50 % de incremento del índice cardíaco (E.D. $_{50}$) igual a 167 ng / ml , y con un margen terapéutico de 100 - 235 ng / ml , con el 95 % de límite de confianza para la E.D. $_{50}$. (21,22,23,24,25,26,27,28,29)

El porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas en el hombre es de un 70 %. Existen discrepancias entre los distintos trabajos sobre la mayoría de los parámetros farmacocinéticos, fundamentalmente debidas a que se realizan sobre pacientes en condiciones fisiopatológicas diferentes, con pautas de dosificación, y con modelos compartimentales distintos. Así se han descrito volúmenes de distribución desde 0,32 a 0,47 l / kg , y más recientemente en pacientes tras cirugía cardíaca, un volumen del compartimento central de 0,102 l / kg , y un volumen de distribución de 1,698 l / kg . (31,32,33,34,35,36,37,205)

Sólo sufre biotransformación hepática una pequeña fracción del fármaco, entre un 10 - 15 %, transformándose en un metabolito glucurónico inactivo. El resto del fármaco se elimina sin metabolizar por el riñón, así en sujetos sanos el 60 % del fármaco se ha eliminado por orina en la dos primeras horas, llegando al 85 - 90 % en las ocho primeras horas de su administración. La tasa de aclaramiento plasmático del fármaco varía entre 0,334 l / kg / h en sujetos sanos, 0,150 l / kg / h en pacientes con insuficiencia cardíaca severa, y 0,188 l / kg / h en pacientes tras cirugía cardíaca. Sin embargo, en cualquiera de estos casos excede a la tasa de filtrado glomerular lo que sugiere que existe un componente de secreción tubular activa renal. (20,21,22,23,24,25,26,32,33,34,35,205)

Los estados patológicos que más influyen sobre la farmacocinética de la milrinona son: los estados de insuficiencia cardíaca severa grado funcional III - IV, de la clasificación de la N.Y.H.A., en los cuales la vida media plasmática se prolonga de 0,63 horas en personas sanas, a 1,7 - 2,6 horas, de forma que el tiempo de eliminación se duplica o triplica. También se ve muy prolongada la vida media de eliminación del fármaco en los estados de insuficiencia renal, debiendo ser ajustada la dosis de perfusión del fármaco en situaciones de aclaramiento de creatinina inferiores a 50 - 40 ml / h. (31,32, 33,34,35,36,37,204,205)

Farmacodinamia

Efectos hemodinámicos

Existen muchos estudios clínicos dedicados a investigar los efectos hemodinámicos de la milrinona, uno de ellos de obligada referencia es el de Anderson y colaboradores (21), en el que examinaba los efectos de diferentes dosis de la milrinona en 189 pacientes con insuficiencia cardíaca clase funcional II - IV, de la N.Y.H.A., y un índice cardíaco menor o igual a 2,5 l /min. / m², o una presión capilar pulmonar igual o superior a 15 mm Hg. Pudiendo comprobar en estos pacientes como el gasto cardíaco se incrementaba entre un 33 - 56 % de media de forma proporcional a las dosis empleadas, igualmente el volumen latido se incrementaba en un 33 - 54 %, por el contrario, la presión capilar pulmonar y las resistencias vasculares sistémicas se reducían un 24 - 33 % y un 15 - 31 %, respectivamente. La presión arterial disminuía levemente entre un 2-16 % según la dosis, sin cambios significativos en la frecuencia cardíaca, que oscilaba entre - 9 % y + 9 % respecto de la frecuencia cardíaca basal. En estos trabajos el 99% de los pacientes tuvieron un mejoría hemodinámica, considerando como tal un incremento del gasto cardíaco o una disminución de la presión capilar pulmonar igual o superior al 20 % de su valor basal.(21)

Estudios posteriores han evaluado distintas pautas terapéuticas de dosificación, considerándose la más adecuada, en la mayoría de las ocasiones, la administración de una dosis inicial de 50 µgr / kg en diez

minutos, seguido de una perfusión continua de 50 $\mu\text{gr} / \text{kg} / \text{min.}$, existiendo una tendencia cada vez mayor en los últimos años a reducir la dosis inicial e incrementar la dosis de perfusión continua. (31,32,33,34,35,36,37,181)

Los efectos de la milrinona sobre la función diastólica miocárdica han sido evaluados en 17 pacientes con clase funcional II - IV de la N.Y.H.A., en los que se ha demostrado que la milrinona incrementa la fracción dp / dt , acorta la constante de tiempo de relajación, e incrementa el volumen máximo de llenado sin incrementar la presión telediastólica del ventrículo izquierdo. Todos estos datos sugieren que la milrinona tiene clínicamente un efecto positivo sobre la relajación ventricular, mejorando la distensibilidad ventricular, aumentando lo que se ha venido a denominar el lusitropismo de ambos ventrículos. (11,12,126,185,206,207)

Varios estudios analizan los efectos de la milrinona sobre el consumo de oxígeno miocárdico, en comparación con otros fármacos, así en 11 pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada, la milrinona no incrementaba el consumo de oxígeno miocárdico, por el contrario sí lo hacía la dobutamina. (35,36,37,208)

Similares resultados se obtuvieron en un estudio comparativo entre la milrinona, el nitroprusiato sódico y la dobutamina, demostrando que sólo la dobutamina incrementaba el consumo de oxígeno miocárdico. Se piensa que la milrinona no incrementa el consumo de oxígeno miocárdico porque reduce la postcarga de ambos ventrículos, lo que sumado a una mayor

relajación ventricular, disminuye la tensión de las paredes ventriculares, no sabiéndose bien si también influye en este efecto la vasodilatación coronaria que la milrinona posee, y que aún no ha sido bien estudiada en el hombre.⁽²⁰⁹⁾

Los efectos vasodilatadores de la milrinona siempre han sido estudiados en un segundo plano, e incluso se presentaron inicialmente como efectos colaterales o adversos, proponiéndose inicialmente este fármaco como un potente inotrópico positivo que a dosis elevadas podía producir hipotensión. Conforme se han ido estudiando mejor los efectos clínicos de la milrinona, su papel vasodilatador ha ido cobrando importancia e interés terapéutico, de tal forma que muchos autores hablan de este fármaco como un inodilatador con efectos positivos sobre la contractilidad miocárdica, ya que los principales beneficios terapéuticos de este fármaco frente al resto de agentes inotrópicos, son debidos a sus efectos vasodilatadores arteriales sistémicos, pulmonares, coronarios y venosos.

Los efectos vasodilatadores de la milrinona están siendo estudiados en los últimos años con más interés, existiendo muy pocos estudios comparativos que nos indiquen la potencia vasodilatadora de la milrinona entre los diferentes territorios vasculares e incluso con resultados no muy homogéneos entre sí. ^(22,23,24,25,26,27,28,29,31,32,33,34,35,36,37,181,210,211,212,213,214,215)

Efectos secundarios

Cuando se inició el ensayo clínico, donde se evaluaba el tratamiento crónico de los estados de insuficiencia cardíaca, con clase funcional III-IV de la N.Y.H.A., con la milrinona oral, se vió que la milrinona incrementaba significativamente la mortalidad frente al grupo placebo, por lo que se suspendió el ensayo y no se autorizó su uso para esta indicación. Por ello actualmente la milrinona ha quedado sólo autorizada para su uso por vía intravenosa, en unidades de cuidados críticos, con monitorización continua hemodinámica y durante periodos cortos de tiempo. (216)

Este incremento en la mortalidad con el tratamiento crónico oral con la milrinona, se achacó sin existir ninguna evidencia de ello a sus posibles efectos arritmogénicos. Sin embargo, los estudios electrofisiológicos realizados en personas sanas y con insuficiencia cardíaca severa durante administraciones intravenosas de la milrinona, de menos de 24 horas de duración, no han demostrado alteraciones significativas en ninguno de los parámetros electrofisiológicos, sólo un pequeño enlentecimiento en la conducción máxima 1:1 aurículo-ventricular, sin significado clínico. (181,190,217)

Por otro lado, existen muchos estudios clínicos que nos indican un incremento en la incidencia de latidos ventriculares prematuros y de taquicardias ventriculares, que es comparable al que se produce con el tratamiento con la dobutamina. El problema fundamental en todos estos

pacientes es poder diferenciar entre los efectos proarritmogénicos ventriculares de la milrinona y los debidos a la enfermedad de base del enfermo. (181,190,217,218)

Si la administración de la milrinona se hace en pacientes con gasto cardíaco disminuído, resistencias vasculares elevadas y con presiones de llenado ventriculares elevadas, el efecto vasodilatador de la milrinona será beneficioso y terapéutico, no produciéndose episodios de hipotensión en más del 1 - 2 % de los pacientes. Por el contrario, aparecerá frecuentemente hipotensión, que fue el efecto secundario más temido inicialmente, si no se dan todos estos requisitos.

La milrinona no tiene efecto cronotrópico positivo directo sobre el corazón, sino que los episodios de taquicardia que puede producir son reflejos, como consecuencia de sus efectos sobre la presión arterial, por tanto si no se producen hipotensiones, no se producirán cambios significativos en la frecuencia cardíaca. (31,32,33,34,35,36,37)

La incidencia de otros efectos secundarios en el tratamiento con la milrinona es muy baja (0,4 - 2 %), lo que hace que en los trabajos con series pequeñas de pacientes ni siquiera estén presentes, dentro de estos efectos secundarios podemos destacar: el dolor precordial en el 1%, cefaleas en el 3 %, hipokaliemia en el 0,6 %, temblores en el 0,4 % y trombocitopenias en el 0,4 %. (21,34,181,213,216)

Los efectos de la milrinona sobre la función plaquetaria han sido estudiados con más detalle en los últimos años, con resultados algo contradictorios, por un lado los resultados *in vitro*, demuestran una acción antiagregante de la milrinona, mediante la inhibición de la síntesis de tromboxano A₂, y por otro lado los estudios clínicos consideran que estos hallazgos no tienen relevancia clínica. (195,196,197,198,199)

5.3.2. Inhibidores de PDE del grupo III imidazólicos

Enoximona

Este derivado imidazólico es un inhibidor selectivo del grupo III de fosfodiesterasas, que posee efectos inotrópicos y lusitrópicos positivos, y vasodilatadores arteriales. Sus características farmacocinéticas principales son: que se biotransforma en el hígado por sulfoxidación en un compuesto metabólicamente activo, aunque menos potente; y presenta una vida media de eliminación muy prolongada, de 3 a 8,1 horas para la enoximona y de 6 a 11 horas para su metabolito activo. (169,219,220,221,222)

Existe poca experiencia mundial en su manejo clínico ya que en muchos países todavía no ha sido aprobada su comercialización. Los

estudios clínicos de Boldt y colaboradores, concluyen que el uso de enoximona antes de la separación de la circulación extracorpórea en cirugía cardíaca, mejora el gasto cardíaco y reduce las necesidades de catecolaminas. (223)

Vincent y colaboradores han estudiado, en pacientes con insuficiencia cardíaca severa, y tratamiento catecolamínico, los efectos de la administración de una dosis única de enoximona. Estos estudios tuvieron como resultado que la enoximona incrementa significativamente el gasto cardíaco y el índice de trabajo ventricular izquierdo, sin grandes cambios en la presión arterial o frecuencia cardíaca. Se necesitan aún muchos más estudios clínicos para definir bien las características de este fármaco. (224)

Piroximona

Es un derivado de la enoximona que aún se encuentra en fase de estudio, por lo que no disponemos por el momento del número suficiente de estudios clínicos, que nos muestren las principales características de este fármaco. En los estudios preliminares, se presenta como un derivado de la enoximona con una vida media de eliminación más corta (1,5 horas), con lo cual el ajuste de dosificación terapéutica sería más fácil que con la enoximona y con una potencia inotrópica mayor. (225,226,227,228,229)

Existen en la actualidad multitud de inhibidores del grupo III de fosfodiesterasas en fase de estudio, lo que indica el interés despertado en la industria farmacéutica por esta familia de fármacos, con propiedades muy diferentes y con posibilidades terapéuticas muy amplias (Tabla V). Se están desarrollando líneas de investigación para conseguir inhibidores selectivos de los otros grupos de fosfodiesterasas, e incluso fármacos con capacidad de inhibir dos familias de fosfodiesterasas, con el fin de tratar enfermedades tan diferentes como al asma bronquial, la hipertrofia prostática benigna, o la hipertensión pulmonar. (188,194,230,231,232,233,234,235,236, 237,238)

TABLA V. Nuevos inhibidores del grupo III de fosfodiesterasas.

Imazodan.

Sulmazole.

Isomazole.

Vesnarinona.

Saterinona, y sus enantiómeros

Pimobendan, y su metabolito activo UD-CG 212.

WIN-58993.

WIN-62005.

WIN-62582.

WIN-63291.

NSP-804.

NSP-805.

TZC-5665, y su metabolito activo el M 2.

ZSY - 27.

ORG-30029.

ORG-20241.

R-80122.

Compuesto 2 f.

Thiazolo(4,5-b)-pyridin-2(3H).

Imidazo(4,5-b)-pyridin-2(3H)

5-cyano-1,6dihydro-6-oxo-(2,3,4-pyridyl)-3-pyridinacarboxilatos.

5-amino-6-cyano-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrido(2,3)pyrimidina.

etcétera.

II. Planteamiento y Objetivos

1. Planteamiento

La milrinona es un fármaco inotrópico positivo y vasodilatador, inhibidor selectivo del grupo III de fosfodiesterasas, cuyo mecanismo de acción es inhibir la degradación de AMPc, de tal forma que incrementa los niveles intracelulares de este nucleótido cíclico. (31,32,33,34,35,36,37)

En 1983, comienzan a ser publicados los primeros trabajos sobre este fármaco, centrándose los estudios en años sucesivos sólo en su efecto inotrópico positivo para el tratamiento a largo plazo de la insuficiencia cardíaca crónica severa (grado funcional III y IV de la N.Y.H.A.) (13,14,15, 16,17). Así, sin haberse realizado suficientes investigaciones sobre el efecto vasodilatador de la milrinona, que por entonces se presentaba, incluso, como un posible efecto colateral del fármaco. Se realiza, ya en 1986, un estudio prospectivo multicéntrico de supervivencia, de tratamiento oral con la milrinona, el estudio PROMISE, que demostró que la milrinona aumentaba la mortalidad frente al grupo tratado con placebo; este estudio hizo que la F.D.A. (Food and Drug Association) prohibiese el empleo de la milrinona por vía oral para el tratamiento crónico de la insuficiencia cardíaca. (216)

Desde entonces la milrinona cayó en un gran desprestigio internacional, y para contrarrestar el efecto negativo del estudio PROMISE, se empezaron a realizar trabajos experimentales serios, y mucho más numerosos, que comenzaron a mostrar posibles novedades terapéuticas de

este fármaco, precisamente al estudiar sus efectos vasodilatadores. (20,21,22,23, 24,25,26,27)

En 1991, se autoriza el empleo de la milrinona por vía intravenosa, para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda o crónica reagudizada, durante un periodo de tiempo inferior a quince días, y bajo monitorización hemodinámica estricta. Con su utilización en la clínica, en seguida comenzaron a observarse beneficios terapéuticos en determinadas circunstancias específicas. Una de ellas son las situaciones de bajo gasto agudo, en las que además nos enfrentamos a una hipertensión pulmonar reagudizada, situación frecuente en el manejo postoperatorio de cirugía cardiovascular y torácica, donde la milrinona presentaba un beneficio adicional frente a la terapéutica inotrópica simpaticomimética convencional, muy probablemente por sus efectos vasodilatadores adicionales, que han comenzado a estudiarse en los últimos años. (31,32,33,34,35,36,37,181)

Por tanto, consideramos interesante conocer más detalladamente los efectos vasodilatadores de la milrinona, sobre todo en el territorio arterial pulmonar, comparándolos con los del sistémico, para buscar posibles diferencias entre ambos territorios, bien en el mecanismo de acción del fármaco, estudiando el papel del endotelio y del óxido nítrico, o bien en la potencia vasodilatadora del fármaco, ya que si la milrinona presenta alguna selectividad vasodilatadora, aunque parcial, sobre el sistema pulmonar, podría justificar el beneficio que este fármaco parece aportar en los

pacientes con fallo ventricular predominantemente derecho, en situación de bajo gasto cardíaco e hipertensión pulmonar reagudizada.

2. Enumeración de objetivos

Por toda esta serie de razones, iniciamos este trabajo, en el que llevamos a cabo el estudio de los efectos vasculares de la milrinona sobre anillos arteriales pulmonares y femorales de conejos Gigante Español sanos, de ambos sexos, con la técnica de registro isométrico de segmentos vasculares aislados, investigando el papel del endotelio y del óxido nítrico sobre los efectos vasculares de la milrinona, planteándonos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la respuesta vascular a la milrinona de segmentos arteriales pulmonares y femorales aislados, con endotelio íntegro, estudiando posibles diferencias, por el sexo de los animales.
2. Estudiar posibles variaciones en los efectos vasculares de la milrinona, sobre anillos arteriales pulmonares y femorales, al retirar el endotelio.

3. Valorar los efectos de la milrinona, en segmentos arteriales pulmonares y femorales con endotelio íntegro, al inhibir selectivamente la síntesis de óxido nítrico con un análogo de la L-arginina, el L-NA.

4. Comparar los efectos obtenidos con la milrinona en el territorio vascular pulmonar, con los obtenidos en las arterias femorales, con endotelio íntegro, sin endotelio, e inhibiendo selectivamente la síntesis de óxido nítrico, con L - NA.

III. Material y Método

1. MATERIAL

1.1. Animales

Los estudios experimentales se llevaron a cabo en segmentos vasculares de arterias femorales y pulmonares de 29 conejos jóvenes sanos, de ambos sexos, y 1,2 - 1,5 kgr de peso, pertenecientes a la raza Gigante Español, capa oscura. Los animales fueron suministrados por el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s / n, Madrid. Los conejos fueron alimentados con una dieta estándar, en el animalario del Departamento de Fisiología de la la Facultad de Veterinaria de la U.C.M, donde permanecieron hasta el momento de ser sacrificados.

No se iniciaron los experimentos hasta transcurridos 7 días desde su traslado desde el Departamento de Producción Animal al Departamento de Fisiología, para evitar posibles alteraciones por el cambio de hábitat. Los animales se sacrificaban siempre el mismo día de la semana, en semanas sucesivas, mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg / kgr de peso), siguiendo las directrices internacionales acerca de las Buenas Formas y Conducta en Experimentación Animal.

A continuación se procedía a la disección de ambas arterias femorales, y de ambas arterias pulmonares principales. Estas arterias se depositaban rápidamente en placas de Petri sobre hielo, bañadas en suero salino al 0,9 % a 4 ° C. Dentro de la placa, ayudados de una lente binocular

Zeiss Stemi SR, equipada de un ocular provisto de escala micrométrica, y de instrumental de microcirugía, se limpiaba cuidadosamente las arterias de la grasa perivascular y adventicia, y se cortaban en segmentos cilíndricos de 3 mm de longitud. Los segmentos arteriales así obtenidos estaban listos para su estudio funcional.

1.2. Sistemas de registro

Disponíamos de un polígrafo GRASS modelo 7, de seis canales, conectado a 6 transductores fuerza - desplazamiento GRASS FT03. Este polígrafo permite imprimir, en papel milimetrado, la tensión que se está produciendo en el transductor, en relación al tiempo, disponiendo de diferentes velocidades de salida del papel, comprendidas entre 2,5 mm/min., y 100 mm/min..

También utilizábamos simultáneamente un amplificador CIBERTEC XL-3000, de seis canales, conectado a otros tantos transductores, (Universal Transducing Cell UC3, Statham microscale accesory UL5), conectado todo ello a un sistema informatizado de registro, con un ordenador IBM 486, DX-100, con el soporte de *software* del programa REG x PC 3.1, que permite la visualización continua del registro, a través de la pantalla del ordenador, almacenando todos los datos en la memoria del ordenador, no

necesitando papel milimetrado para el registro, aunque dispone de la opción de transferir el registro de la pantalla a papel mediante impresora. Además, permite una serie de opciones, que facilitan el procesamiento posterior de los datos, así como su interpretación gráfica.

1.3. Reactivos, productos químicos, y fármacos utilizados

Como líquido nutricional para el baño de órganos se empleó la solución de Krebs-Henseleit, cuya composición es la siguiente: ClNa, 115mM; Clk, 4,6 mM; PO₄ H₂K, 1,2 mM; SO₄ Mg, 1,2 mM; Cl₂ Ca, 2,5 mM; CO₄ HNa, 25mM; glucosa, 11,1 mM y EDTA H₂ Na₂ , 0,01 mM. Se preparaba diariamente, antes de iniciar los experimentos, con agua bidestilada y desionizada, a la que se le añadía todas estas sustancias, salvo el Cl₂ Ca que se añadía al final, transcurridos 20 minutos de mezclar el resto de componentes, burbujeándolo con carbógeno (95 % O₂ y 5 % de C O₂), para evitar que el calcio precipite, y así esté en la concentración adecuada. Todas estas sustancias procedían de la casa comercial Merck, y eran de la máxima pureza, siendo pesadas en balanzas de alta precisión.

Como sustancias vasoconstrictoras se empleó Clk (Merck), bitartrato de L - noradrenalina (Sigma), y clorhidrato de fenilefrina (Sigma). Las soluciones de estas sustancias se realizaban diariamente en agua bidestilada

y desionizada, y además, la solución de noradrenalina, se mantenía constantemente en hielo, se protegía de la luz y con el fin de prevenir su oxidación, añadíamos ácido ascórbico (10^{-4} M).

Para estudiar los efectos agonistas simpaticomiméticos de estos vasoconstrictores, de forma selectiva, separando las acciones sobre los receptores α_1 , α_2 , y β adrenérgicos, utilizamos antagonistas selectivos de estos receptores. Como antagonista de los receptores β , se utilizó clorhidrato de propranolol (Sumial, ICI - Farma), como antagonista de los receptores α_1 , se empleó clorhidrato de prazosín (Pfizer), y como antagonista de los receptores α_2 , el clorhidrato de yohimbina (Sigma).

La desaparición del endotelio de los segmentos vasculares desendotelizados era comprobada funcionalmente, mediante el empleo de acetilcolina clorhidrato (Sigma), y de trifosfato de adenosina (ATP) (Sigma). El ATP era disuelto, justo antes de su uso, en agua bidestilada y desionizada fría, a 4°C, la solución madre se mantenía en hielo conforme se iba añadiendo en las copas, y se despreciaba lo que quedase de solución madre, una vez administrado en la última copa.

Para estudiar los efectos del óxido nítrico (NO), en la vasodilatación producida por la milrinona, se empleó como inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, la N^G - nitro - L - arginina (L - NA) (Sigma), y como agonista de la síntesis de NO, se empleó la L - arginina (Sigma).

La milrinona se empleó pura, en forma de polvo, cedida amablemente por el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (Sigma), y en forma de lactato de milrinona (Sterling - Winthrop). La milrinona en polvo se disolvió en agua bidestilada y desionizada, acidificando la solución con ClH, hasta conseguir una mezcla homogénea, cuando se alcanza un pH de 2, con una concentración de la solución madre de 2 mg/ml. El lactato de milrinona viene disuelto por Sterling - Winthrop, en solución acuosa, a una concentración de 1 mg/ml, junto con dextrosa a una concentración de 4,7 gr/ml, y ácido láctico, hasta conseguir un pH de la solución de 4.

Las soluciones de fármacos se administraron con micropipetas de precisión (Brand), no sobrepasando, en ningún caso, el volumen añadido, el 0,5 % del volumen inicial de la copa.

2. MÉTODO

2.1. Procedimiento experimental

Los segmentos arteriales femorales y pulmonares se montaron, en un sistema para el registro de la respuesta isométrica contráctil, en baños de órganos aislados. La preparación experimental se consigue al introducir por la luz de los segmentos vasculares, dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable de 50 μm de diámetro cada uno. Esta delicada inserción se debe realizar bajo visión directa con lupa binocular, y con gran delicadeza para evitar dañar involuntariamente el endotelio de los segmentos vasculares que queremos estudiar con endotelio íntegro.

Uno de los alambres acerados está unido a un soporte fijo que a su vez se fija a la pared del baño de órganos; y el otro alambre, introducido por la luz del segmento vascular, es móvil y se desplaza paralelamente al anterior y va conectado a un transductor fuerza - desplazamiento (Universal Transducing Cell UC3, Statham microscale accesory UL5; y GRASS FT03) que convierte los cambios de tensión en estímulos eléctricos de bajo voltaje.

Tras su montaje, las preparaciones se introducen en copas de Allhin modificadas que contienen 30 ml de solución de Krebs-Henseleit; esta solución se mantiene a una temperatura constante de 37 ° C, gracias a un serpentín que baña las paredes de las copas de Allhin. Estas copas poseen

como característica principal una doble pared de vidrio, la cual forma parte de un circuito cerrado que conecta las diferentes copas entre sí, y por cuyo interior circula agua caliente a una temperatura constante en todo su recorrido, por un dispositivo que consta de una bomba, una resistencia y un termostato programable (Ultra Thermostat Ks Colora).

Con el doble fin de mantener oxigenada esta solución y equilibrarla en un pH de 7,3 y 7,4, la solución es constantemente burbujeada a través de una fina cánula, en la parte inferior de la copa, con carbógeno que es una mezcla gaseosa de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ (Sociedad Española de Oxígeno. S.A.). El pH de la solución se comprueba antes de comenzar cualquier experimento, con un pH - metro de laboratorio, modelo 2001 de Crison.

Además, las copas de Allhin modificadas disponen de un sistema de lavado de las preparaciones, por cuya parte inferior se puede eliminar el líquido de la copa, y por su parte superior se puede añadir la solución o fármaco deseado. También disponen de un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza, que permite aplicar al segmento vascular la fuerza de distensión pasiva deseada, separando los dos alambres, y al mismo tiempo permite medir el desplazamiento del alambre móvil.

Disponíamos de dos equipos completos de registro y estudio, con seis canales cada uno, que hacían un total de doce canales con sus respectivas copas de baño de órganos, con lo cual preparábamos doce segmentos

vasculares por cada animal sacrificado, con lo que optimizábamos al máximo las arterias femorales y pulmonares de los conejos, como recomiendan las directrices internacionales acerca de las Buenas Formas y Conducta en Experimentación Animal.

Además al disponer de seis canales en cada equipo pudimos eliminar sesgos de individualidad animal, así como de las características de los aparatos, montando siempre tres segmentos vasculares femorales y tres segmentos pulmonares en cada equipo, y siempre el mismo número de segmentos vasculares tratados con uno u otro fármaco, en cada equipo. Para evitar también sesgos por el canal de registro, no se colocaban siempre en un mismo orden los segmentos pulmonares y los femorales, alternando en días sucesivos el orden de distribución de los vasos en las copas de baño de órganos.

Para preparar los segmentos arteriales sin endotelio, antes de montarlos en los alambres, se les pasa por el interior de su luz, un alambre de acero inoxidable de 200 μm , y superficie suavemente rugosa que desprende la capa endotelial de los vasos sin dañar la capa muscular, al hacer girar sobre su superficie los segmentos vasculares insertados en dicho instrumento.

La desaparición del endotelio se comprobaba funcionalmente, mediante el registro de los efectos vasodilatadores de la acetilcolina, a la concentración en baño de 10^{-5} M, en las arterias femorales, y mediante el registro de los efectos vasodilatadores del ATP, en las arterias pulmonares, a

la concentración en baño de 10^{-5} M, estas sustancias provocan relajación completa de los segmentos vasculares, previamente contraídos con un agente vasoconstrictor estable, en presencia de endotelio funcionante, porque estimulan la producción y liberación de NO endotelial que relaja la fibra lisa vascular. Esta prueba funcional es más importante que el estudio morfológico de los segmentos vasculares, ya que nos muestra si existe endotelio, y a la vez si este se encuentra fisiológicamente en buenas condiciones, o por el contrario si ha sido dañado durante su preparación.

Se consideraron arterias sin endotelio, aquellas que habían sido previamente desendotelizadas, y no se relajaban más de un 20 % tras la administración de ATP o de acetilcolina. Por el contrario, se consideraron arterias con endotelio íntegro aquellas en las que no se había desendotelizado su superficie luminal, y se relajaban más del 80 % , tras la administración de ATP o de acetilcolina.

Utilizando esta técnica de baño de órganos se determinó, en primer lugar la tensión basal de trabajo y la respuesta isométrica de las arterias femorales y pulmonares de conejo, a distintas sustancias vasoconstrictoras, determinando seguidamente las curvas dosis-respuesta de la milrinona, en ambos territorios vasculares. Posteriormente, se analizó el papel del endotelio y del óxido nítrico, conjuntamente y por separado, en la respuesta vasodilatadora de la milrinona, en los territorios vasculares pulmonar y femoral de conejos.

Un esquema simplificado de los equipos de registro utilizados en la realización de nuestro trabajo se muestra en la Figura 1.

2.2. Tensión basal

Antes de proceder al análisis de la respuesta arterial a los estímulos vasoactivos en una serie de experimentos, se determinó previamente la tensión basal de respuesta vascular. Para ello se analizó la respuesta vascular producida por el cloruro potásico (Clk) (50 mM), después de exponer las arterias a distintas tensiones pasivas. La tensión pasiva a la que se obtuvo la máxima respuesta fue considerada como la tensión óptima de respuesta vascular.

A veinticuatro segmentos arteriales pulmonares y otros veinticuatro femorales, todos ellos con endotelio, procedentes de cuatro conejos, dos machos y dos hembras, se les aplicaron tensiones pasivas de 100, 300, 600, 1000, 1300, 1600 y 2000 mg, en secuencias elegidas al azar y en cada tensión se registró la respuesta vascular al Clk. Para aplicar la tensión pasiva deseada, los segmentos eran distendidos separando los dos alambres, mediante el desplazamiento del tornillo micrométrico.

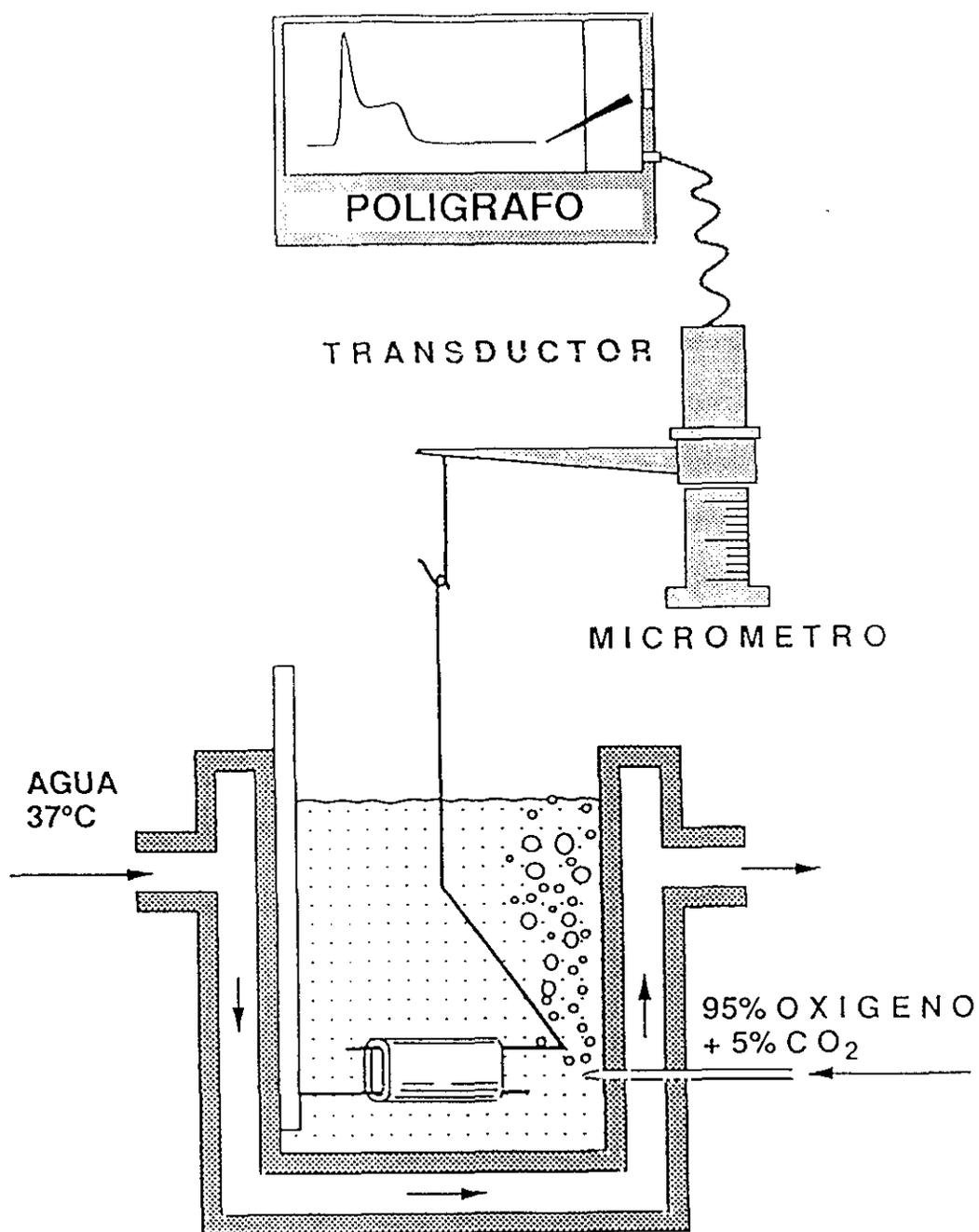


Figura 1. Representación esquemática del modelo experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica a 37 ° C.

Cuando los segmentos arteriales eran distendidos se producía un aumento inmediato de la tensión pasiva, seguido de una relajación, y la tensión se reajustaba al valor deseado, distendiendo repetidamente los segmentos hasta que se equilibraba en la tensión buscada. Una vez equilibradas, las arterias se activaban con Clk que se añadía al baño para alcanzar una concentración de 50 mM, y se medía la contracción en el punto máximo.

En estos estudios preliminares, se encontró que la tensión pasiva, en la que se obtuvo la respuesta máxima, estaba comprendida entre 1300 - 1600 mg, tanto para las arterias femorales, como para las pulmonares, por lo que se consideró como tensión basal de trabajo 1500 mg. Por ello, los estudios de la respuesta a los estímulos vasoconstrictores, se llevaron a cabo en las arterias previamente distendidas, y estabilizadas en 1500 mg de tensión pasiva, precisando los segmentos arteriales pulmonares un tiempo de estabilización mayor para conseguir la tensión basal, que los segmentos femorales, así las arterias femorales se estabilizaban en 50 - 70 minutos, mientras las arterias pulmonares necesitaban más tiempo, entre 100 y 120 minutos.

2.3. Diseños experimentales

Los anillos vasculares una vez estabilizados en la tensión óptima de trabajo, durante al menos sesenta minutos, para las arterias femorales, y 120 minutos para las pulmonares, sin cambios de tensión, se les sometía inicialmente a un estímulo vasoconstrictor con Clk, para estudiar la contractilidad del músculo liso vascular, ante una despolarización directa de la membrana muscular, y así se comprobó, la capacidad funcional de las fibras musculares lisas, registrando su respuesta contráctil a una concentración submáxima de Clk de 50 mM.

Esta concentración submáxima fue determinada en experimentos preliminares, en los que realizamos curvas dosis-respuesta al Clk a distintas concentraciones (10, 20, 30, 50 y 100 mM), en arterias femorales y pulmonares, con y sin endotelio. El Clk se añadía de forma acumulativa al baño para alcanzar las diferentes concentraciones deseadas, y se medía a continuación el punto de máxima respuesta.

Con esta contracción se comprobaba la integridad, y funcionalidad de la capa media vascular, ya que si alguna preparación no alcanzaba una contracción submáxima, es que habíamos destruido las fibras musculares vasculares, en algún momento de la preparación, y esa preparación era retirada de estudio, y se sustituía por otra nueva. Posteriormente, las preparaciones eran lavadas con solución de Krebs-Henseleit a 37 ° C de

temperatura, libre de fármaco agonista, repetidas veces, hasta conseguir, una vez más la estabilización de la preparación, en la tensión basal.

Para estudiar el papel del endotelio, en la respuesta vascular de la milrinona, se prepararon segmentos arteriales femorales y pulmonares desendotelizados, con la técnica anteriormente comentada. Para comprobar funcionalmente la integridad o no del endotelio, se administraba al baño, fenilefrina (10^{-5} M), y una vez que se alcanzaba una contracción estable, se administraba en las preparaciones acetilcolina (10^{-5} M) o ATP (10^{-5} M), que provocan vasodilatación, cuando el endotelio está íntegro, mediante la estimulación de la liberación de NO. Se expresó la integridad del endotelio en porcentaje, haciéndose equiparable al porcentaje de inhibición que estas sustancias producían sobre el efecto contráctil de la fenilefrina.

Para estudiar el papel del óxido nítrico (NO), en la acción vasodilatadora de la milrinona, independientemente del resto de factores moduladores del endotelio, un grupo de segmentos arteriales pulmonares y femorales con endotelio, se incubaron con N^G-nitro-L-arginina (L-NA) a una concentración de 10^{-5} M. Este inhibidor de la síntesis de NO, se añadía al baño 30 minutos antes de inducir la vasoconstricción con fenilefrina (10^{-5} M) y permanecía hasta el final del experimento, realizándose a continuación la curva dosis - respuesta de la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4} M). Posteriormente, se añadía al baño un agonista de la síntesis de NO, la L-arginina (10^{-5} M), durante 30 minutos y se volvía a realizar una nueva curva dosis-respuesta con la milrinona, para revertir los posibles

efectos producidos por el L - NA, sobre los territorios vasculares pulmonar y femoral de conejo.

Transcurrido este tiempo se administraba un agente agonista α -adrenérgico a concentraciones submáximas, tanto en arterias femorales como en pulmonares, con y sin endotelio. Se utilizaron dos agentes, la noradrenalina, agonista α_1 y α_2 adrenérgico, a una concentración de 3×10^{-6} M y la fenilefrina, agonista α_1 adrenérgico, a una concentración de 10^{-5} M.

Estas concentraciones submáximas se determinaron en estudios preliminares, en los que se realizaron curvas dosis-respuesta, con noradrenalina a distintas concentraciones, desde 10^{-9} hasta 10^{-4} M, y con fenilefrina, a iguales concentraciones, en arterias femorales y pulmonares, con y sin endotelio. Estos fármacos se añadían de forma acumulativa al baño para alcanzar las diferentes concentraciones deseadas, y se medía a continuación el punto de máxima respuesta. Todas las curvas dosis-respuesta para los agonistas adrenérgicos utilizados, se realizaron en presencia de propranolol (10^{-6} M), para bloquear un posible efecto β - adrenérgico de los fármacos. El propranolol, se añadía 20 minutos antes de proceder a registrar las curvas dosis-respuesta, para los agonistas α - adrenérgicos. Además para comprobar la especificidad de la fenilefrina sobre los receptores α_1 adrenérgicos, se realizaron las curvas dosis-respuesta para la fenilefrina en presencia de prazosín (10^{-6} M), que es un antagonista α_1 , tanto en arterias femorales, como pulmonares, con y sin endotelio.

Se comprobó, también en los estudios preliminares, que la contracción inducida, tanto por noradrenalina, como por fenilefrina, a las concentraciones antes señaladas, eran contracciones estables que no sufrían variaciones, durante al menos más de 70 minutos.

Una vez obtenida una respuesta contráctil máxima y estable, se procedía al registro de las curvas dosis-respuesta para los efectos vasodilatadores de la milrinona. Se añadían al baño concentraciones progresivamente crecientes y acumulativas de la milrinona, para alcanzar concentraciones desde 3×10^{-8} M hasta 10^{-4} M, para determinar si este fármaco podía relajar la contracción previamente establecida. Antes de la adición de la siguiente concentración de la milrinona al baño, se esperaba el tiempo suficiente para que la concentración previa ejerciera su efecto vasodilatador máximo, y éste fuera estable.

Al finalizar las curvas dosis-respuesta, las preparaciones eran lavadas con solución de Krebs-Henseleit a 37° C de temperatura, libre de fármacos, repetidas veces, hasta conseguir, una vez más la estabilización de la preparación en la tensión basal, al menos durante 20 minutos sin cambios, y se volvía a administrar Clk (50 mM), y se comparaba la respuesta vasoconstrictora, con la obtenida al inicio del experimento, para valorar la supervivencia de la preparación, y si existía una diferencia superior a un 10 %, los resultados de ese segmento vascular no se tenían en cuenta.

También se volvía a comprobar la integridad funcional del endotelio, sólo en los segmentos vasculares no desendotelizados, mediante la administración nuevamente de fenilefrina (10^{-5} M), y posteriormente de acetilcolina (10^{-5} M), o ATP (10^{-5} M), y de igual forma, se comparaba la respuesta vasodilatadora, con la obtenida al inicio del experimento, para valorar la supervivencia del endotelio, y si existía una diferencia superior a un 10 % con el porcentaje de endotelio íntegro al inicio del trabajo, los resultados de ese segmento vascular no se tenían en cuenta.

2.4. Determinación de curvas dosis-respuesta

Para determinar las curvas dosis-respuesta de un fármaco vasodilatador, como es la milrinona, primero debemos provocar una vasoconstricción de esos vasos, con un fármaco agonista que produzca una vasoconstricción estable y duradera, ya que no se debe alterar mientras dure la realización completa de la curva dosis-respuesta.

Una vez conseguida una contracción estable, comenzamos a añadir directamente en el baño de órganos, y de forma acumulativa, concentraciones progresivamente mayores de la milrinona, hasta conseguir su efecto vasodilatador máximo para cada concentración, terminando la curva, cuando se alcanza la vasodilatación completa, o en su defecto unas

concentraciones molares superiores a 10^{-4} moles / litro, ya que pueden considerarse inespecíficos, los efectos que se producen a concentraciones superiores a éstas. Las concentraciones se expresan en moles por litro, y representan la concentración final que se alcanza en el baño, y no la concentración en *la solución madre*, o solución de fármaco inicial.

En cada curva dosis-respuesta se calculó la ED_{50} (concentración del fármaco que produciría la mitad del efecto máximo), para lo que se determinaba la mitad del efecto máximo producido por el agonista, y las concentraciones que lo acotaban. A continuación, se calculaba la concentración correspondiente a la mitad del efecto máximo, mediante una proporción entre el efecto, y el logaritmo de la concentración. El valor medio de la ED_{50} , y su intervalo de confianza, se calcularon mediante la media y el intervalo de confianza del 95 % de los (-) logaritmos en base 10 de las ED_{50} (pD_2), ya que dichos logaritmos se ajustan a una distribución normal.

En nuestro caso, al tratarse de curvas dosis-respuesta de inhibición, donde el efecto que se está midiendo, es la inhibición de una acción agonista previa, provocada con otro fármaco distinto, se habla en vez de dosis eficaz 50 (ED_{50}), de dosis inhibitoria 50 (ID_{50}).

2.5. Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos se expresan como la media \pm error estándar de la misma, para un determinado número (n) de experimentos. Para expresar la concentración del fármaco que produce el cincuenta por ciento del efecto farmacológico máximo, o dosis eficaz cincuenta (ED_{50}), utilizamos la pD_2 que es el menos logaritmo en base diez de la ED_{50} , para facilitar la expresión de los resultados.

La comparación de las medias se realizó utilizando el índice t de *Student* para la prueba de la significación de promedios, y una probabilidad menor del 5 %, a favor de la hipótesis de nulidad se consideró estadísticamente significativa.

IV. Resultados

1. Estadística descriptiva

1.1. Animales

En el presente trabajo hemos estudiado 170 segmentos vasculares de arterias femorales, y 174 segmentos de arterias pulmonares, procedentes de 29 conejos Gigante Español capa oscura, 17 machos y 12 hembras, de pesos comprendidos entre 1,35 kgr y 1,525 kgr, con una media de $1,420 \pm 0,082$ kgr (Figura 2). El diámetro externo de dichos vasos, en fresco, varió de 925 a 1175 μm (media de $1084 \pm 109 \mu\text{m}$) para las arterias femorales, y de 850 a 975 μm (media de $924 \pm 83 \mu\text{m}$) para las arterias pulmonares.

1.2. Relación tensión pasiva - contracción

Se utilizaron seis conejos, tres machos y tres hembras, para el estudio de la tensión basal de trabajo, de los que se obtuvieron seis preparaciones arteriales pulmonares y seis femorales por cada animal, lo que hacen un total de 36 segmentos arteriales pulmonares y 36 más femorales.

A estos segmentos se les aplicaron tensiones pasivas de 100, 300, 600, 1000, 1300, 1600, y 2000 mg., en secuencias elegidas al azar, y una vez estabilizados en cada tensión, se registró la respuesta vascular al Clk

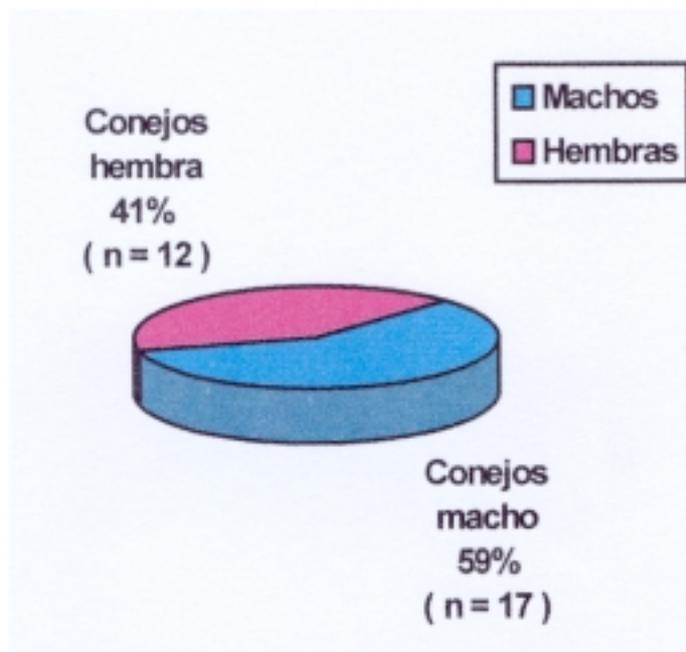


Figura 2. Animales: distribución según sexo. Se estudiaron 29 conejos de la raza Gigante Español, 17 machos y 12 hembras de los que se prepararon 170 segmentos arteriales femorales y 174 pulmonares.

(50 mM); todas las arterias respondían con una contracción, y la fuerza desarrollada variaba, según la tensión pasiva aplicada previamente.

La respuesta máxima para los segmentos arteriales femorales fue de $6,1 \pm 0,58$ gr. , para una tensión pasiva de 1300 mg. no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la fuerza desarrollada a las tensiones comprendidas entre 1000 y 1600 mg.

Los segmentos arteriales pulmonares presentaron una respuesta máxima vasoconstrictora de $3,2 \pm 0,75$ gr., cuando habían sido estabilizados en una tensión de 1600 mg. , no presentándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la fuerza desarrollada por los diferentes segmentos arteriales pulmonares al someterse a las tensiones comprendidas entre 1300 y 2000 mg. Tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas, con una ($p > 0,05$), entre las tensiones pasivas óptimas obtenidas de los conejos machos y hembras, tanto para los segmentos arteriales pulmonares, como para los femorales, para las mismas concentraciones de Clk.

Dado que los rangos de tensiones pasivas de los segmentos arteriales pulmonares y femorales estaban superpuestos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas, y con el fin de evitar posibles errores posteriores y facilitar el protocolo de trabajo, decidimos adoptar como tensión basal de trabajo para todas las preparaciones, 1500 mg., que era un

valor promedio, entre los dos máximos obtenidos para cada tipo de vaso arterial (Figura 3).

1.3. Respuesta vasoconstrictora

Para los estudios de la respuesta vasoconstrictora a diferentes agentes, se utilizaron seis conejos, cuatro machos y dos hembras, de los que se obtuvieron un total de 72 preparaciones arteriales, de las que 36 eran femorales y las otras 36 pulmonares. A su vez, la mitad de las arterias pulmonares y la mitad de las femorales se desendotelizaron, para realizar el estudio de la respuesta en vasos con y sin endotelio. Obtuvimos, en cada segmento la curva dosis respuesta a cada uno de los tres agentes vasoconstrictores ensayados: Clk, noradrenalina, y fenilefrina, tras varios lavados con solución de Krebs - Henseleit, empleándose estos fármacos en orden aleatorio.

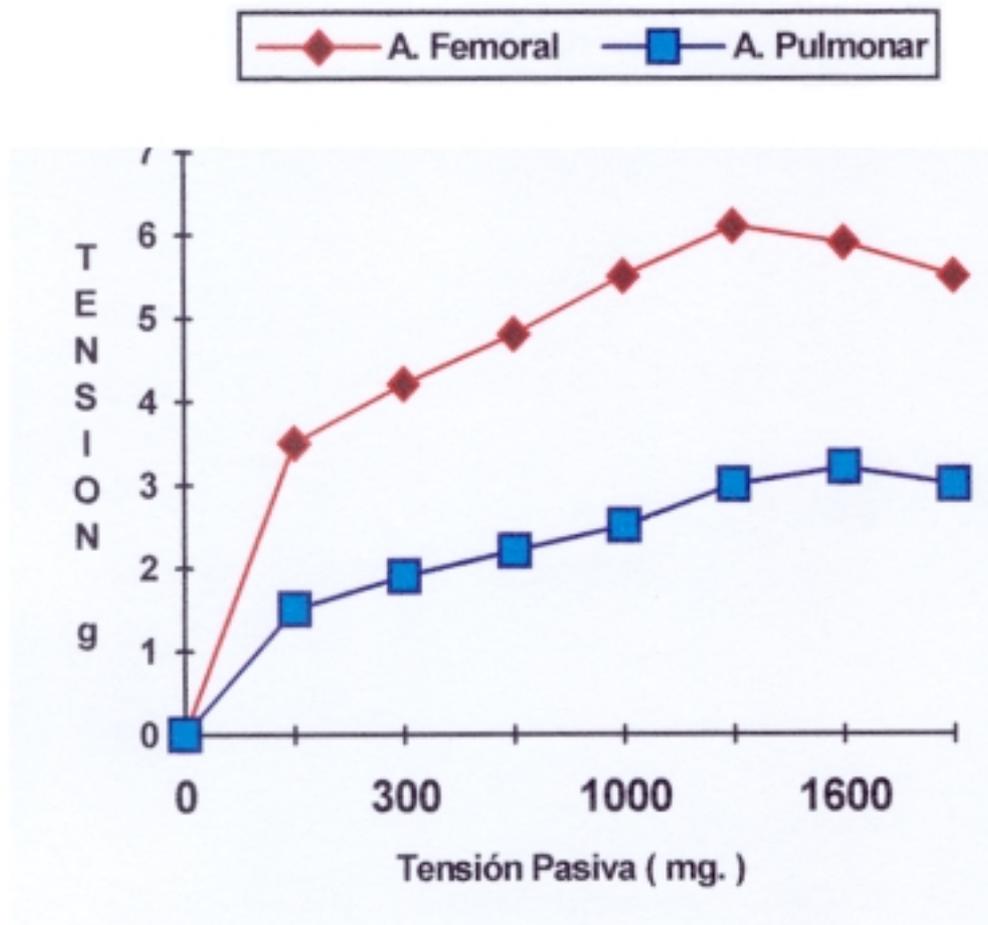


Figura 3. Relación entre la tensión pasiva (mg.) y la respuesta contráctil (gr.) al Clk (50 mM) de 36 segmentos arterias femorales (rombos rojos) y otros 36 pulmonares (cuadrados azules).

1.3.1. Respuesta al Clk

Los resultados obtenidos tras realizar curvas dosis respuesta de Clk a distintas concentraciones, desde 10 hasta 100 mM, tanto en segmentos arteriales femorales y pulmonares, con y sin endotelio, demostraron que todos los segmentos arteriales sometidos a una tensión óptima de 1500 mg respondían con contracción al Clk, que fue dependiente de la dosis. El aumento de tensión isométrica se iniciaba rápidamente y se mantenía en forma de meseta.

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas dosis respuesta al Clk, de las arterias pulmonares con y sin endotelio ($p > 0,05$). Tampoco la presencia o ausencia de endotelio, modificó significativamente la respuesta vasoconstrictora al Clk en las arterias femorales de conejos.

La contracción desarrollada por las arterias pulmonares fue significativamente menor ($p < 0,01$) que la desarrollada por las arterias femorales a iguales dosis de Clk, independientemente de la presencia o no de endotelio íntegro. En las arterias femorales, la respuesta contráctil máxima ($6,9 \pm 0,64$ gr.) se consiguió con una concentración de Clk de 80 mM, y en las arterias pulmonares ($3,8 \pm 0,84$ gr.) con 100 mM de Clk. Pero en estas últimas, la respuesta obtenida con 100 mM no era significativamente superior ($p > 0,05$) a la alcanzada con 50 mM, por lo que en los siguientes estudios se utilizó la concentración de 50 mM de Clk

para valorar el estado funcional de ambos tipos de arterias. De tal forma, que cuando se probó la viabilidad funcional de cada segmento vascular en los estudios posteriores, también se observó que 50 mM de Clk, producen una contracción comparable a la descrita anteriormente. La Figura 4 y 5, y la Tabla VI, resumen la respuesta inducida por el Clk (10 - 100 mM), en las arterias femorales y pulmonares, con y sin endotelio.

1.3.2. Respuesta α - adrenérgica

Se emplearon como agentes α - agonistas, noradrenalina y fenilefrina; ambos fármacos produjeron una contracción dosis dependiente de las arterias pulmonares y femorales, con y sin endotelio.

1.3.2.A. Noradrenalina

Arteria Pulmonar

Las arterias pulmonares con endotelio respondieron con una contracción dosis dependiente, siendo la pD_2 de $1,3 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M y el efecto máximo de $3,5 \pm 0,54$ gr.

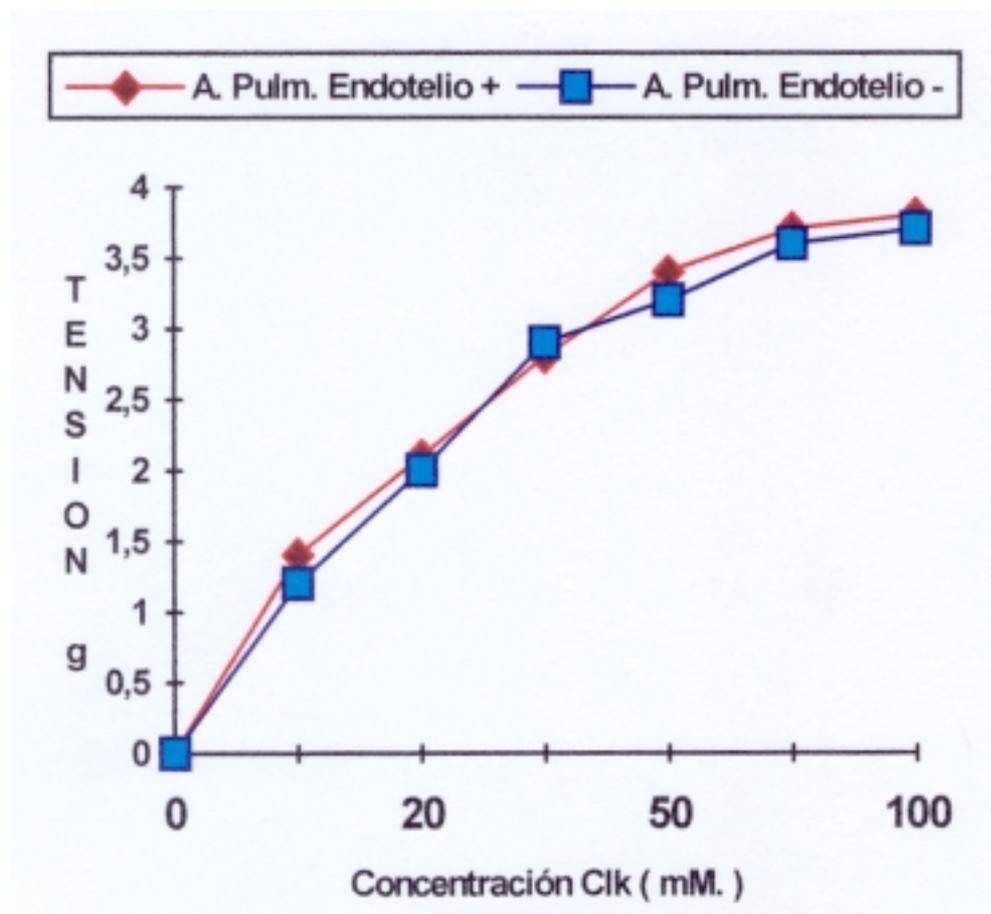


Figura 4. Curvas dosis - respuesta al Clk (10 - 100 mM) en arterias pulmonares con endotelio (rombos rojos), y sin endotelio (cuadrados azules).

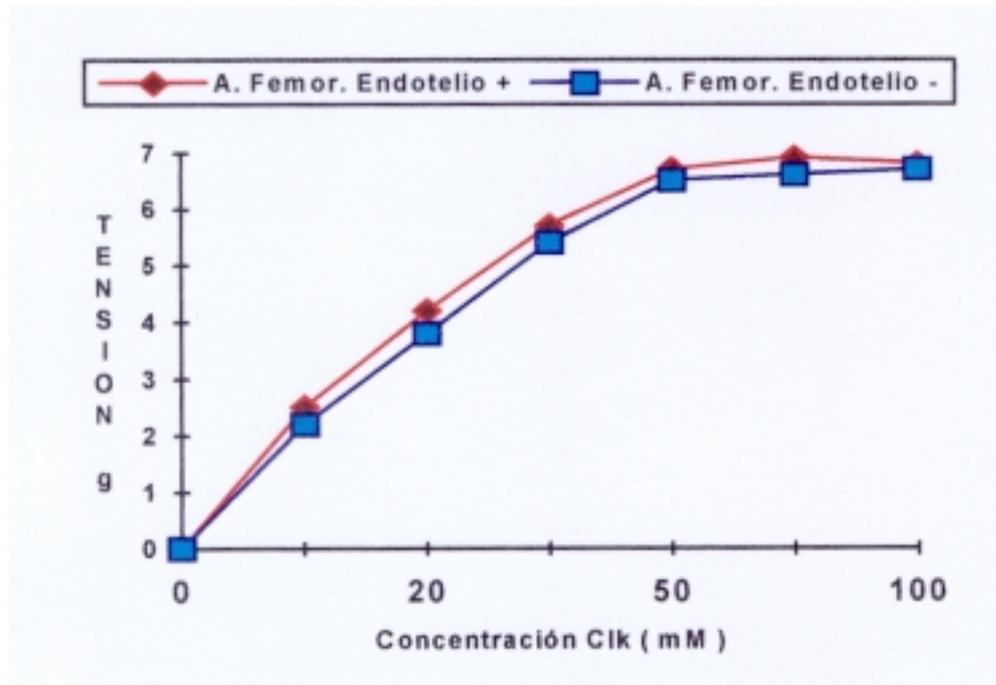


Figura 5. Curvas dosis - respuesta al Clk (10 - 100 mM) en arterias femorales con endotelio (rombos rojos) y sin endotelio (cuadrados azules).

	ARTERIAS PULMONARES	ARTERIAS FEMORALES
CON ENDOTELIO	3,2 ± 0,75	6,1 ± 0,58
SIN ENDOTELIO	3,1 ± 0,51	5,9 ± 0,43

Tabla VI. Respuesta contráctil (gr. ± SD) producida por el Clk (50 mM) en arterias pulmonares y femorales con y sin endotelio.

En la curva dosis respuesta, se comprobó que la noradrenalina a dosis superiores a 3×10^{-5} M, produce vasodilatación de las arterias pulmonares de conejo; este efecto se revertía añadiendo al baño propranolol a dosis de 10^{-6} M, llevando nuevamente la curva al punto de contracción máxima obtenido con dosis menores de noradrenalina. Este efecto vasodilatador se explica por la pérdida de la selectividad por los receptores α adrenérgicos, y estimulación de los receptores β - adrenérgicos.

La contracción de las arterias pulmonares sin endotelio inducida con noradrenalina no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la inducida en arterias pulmonares con endotelio. La contracción máxima fue un 10 % menor en las arterias sin endotelio, pero la prueba de significación estadística presentó una ($p > 0,05$) (Tabla VII y Figura 6).

También se estudió el tiempo que permanecía estable la contracción inducida por noradrenalina, en arterias pulmonares con y sin endotelio, a una concentración submáxima de 3×10^{-6} M. En las arterias desendotelizadas, la contracción permanecía estable durante más de 70 minutos. En las arterias con endotelio íntegro, la contracción estable tuvo una duración media de 49 ± 9 minutos, comenzando a relajarse de forma gradual y espontánea a partir de este momento.

Tipo de arteria	p D ₂ (M)	Tensión máxima (gr.)
Arteria Pulmonar		
Con endotelio	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$3,5 \pm 0,54$
Sin endotelio	$8,2 \pm 0,07 \times 10^{-8} \text{ M}$	$3,4 \pm 0,44$
Arteria femoral		
Con endotelio	$3,4 \pm 0,07 \times 10^{-7} \text{ M}$	$6,89 \pm 0,47$
Sin endotelio	$3,1 \pm 0,08 \times 10^{-7} \text{ M}$	$6,53 \pm 0,34$

Tabla VII. pD₂ (M) y respuesta contráctil máxima (gr. \pm SD), que se obtuvo con noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M) en arterias pulmonares y femorales, con y sin endotelio.

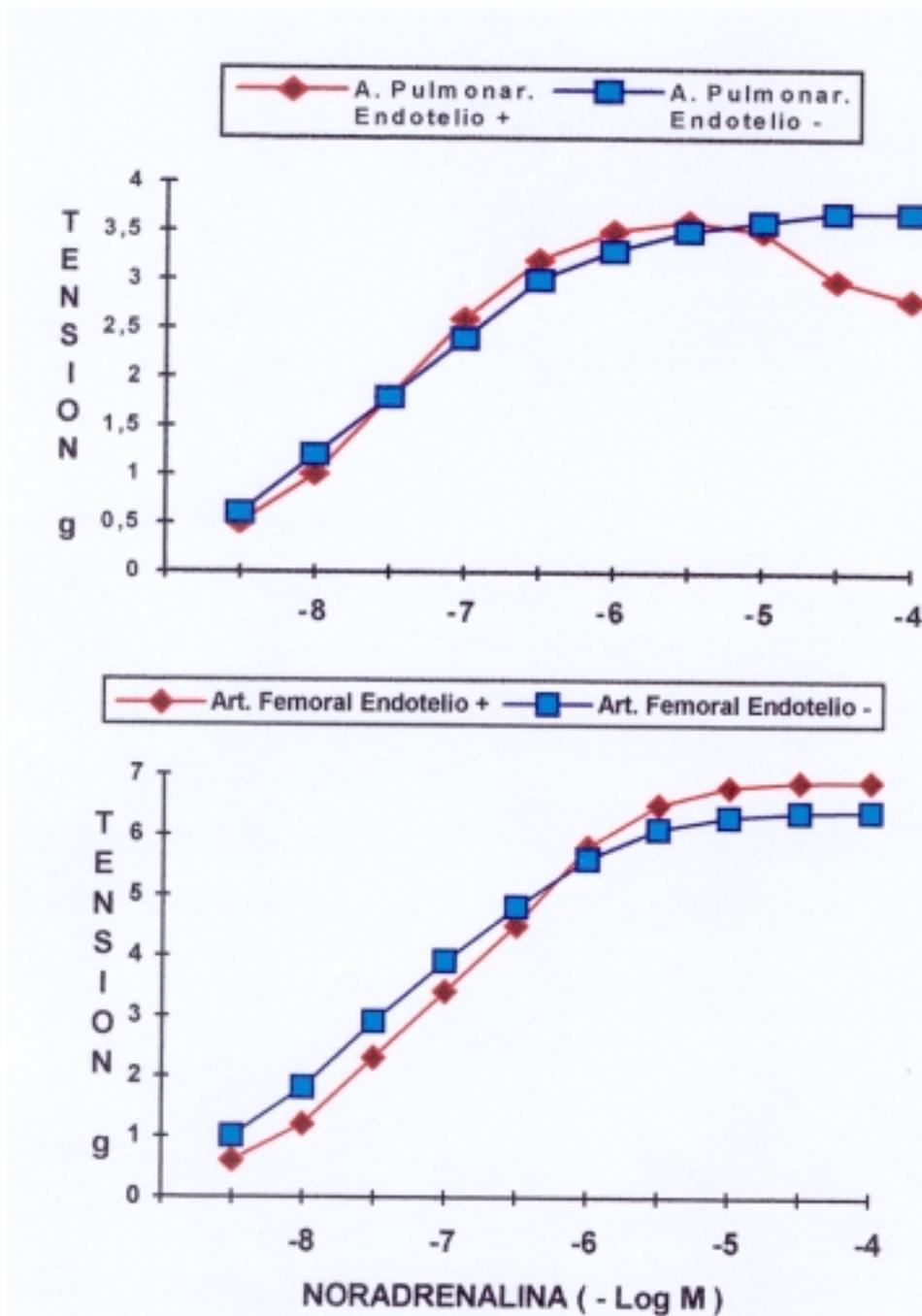


Figura 6. Respuesta contráctil (gr.), de las arterias pulmonares y femorales, con y sin endotelio, a la noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M).

Arteria Femoral

Las arterias femorales con endotelio se contrajeron en presencia de noradrenalina de forma dosis dependiente, proporcionando una pD_2 de $3,4 \pm 0,07 \times 10^{-7}$ M, y un efecto máximo de $6,89 \pm 0,47$ gr. Comparando con los efectos producidos en arterias pulmonares, la sensibilidad, en términos de la pD_2 , fue significativamente superior en las arterias femorales que en las pulmonares, y la contracción máxima fue un 25 % menor en arterias pulmonares que en arterias femorales.

En las arterias femorales, el efecto máximo vasoconstrictor se obtenía a partir de concentraciones de noradrenalina en el baño de 10^{-5} M, no consiguiéndose una mayor contracción con dosis superiores, pero tampoco observándose efectos vasodilatadores en concentraciones de 3×10^{-5} M hasta 10^{-4} M.

En las arterias femorales sin endotelio, no se observaron diferencias significativas, en la curva dosis respuesta, con respecto a las que preservaron el endotelio íntegro, presentando una misma sensibilidad a la noradrenalina, y una contracción máxima un 5 % menor en las arterias sin endotelio, diferencia que no se mostró estadísticamente significativa, estos resultados se expresan en la Tabla VII y la Figura 6 .

La duración de la contracción inducida por noradrenalina con una sólo dosis de 3×10^{-6} M de una forma estable, en arterias femorales, fue de

54 \pm 13 minutos, apareciendo una relajación gradual y espontánea, a partir de este momento, en los segmentos con endotelio íntegro, y permaneciendo la contracción estable por más de 70 minutos, en los segmentos sin endotelio.

1.3.2.B. Fenilefrina

Arteria Pulmonar

Las arterias pulmonares con endotelio respondieron a la fenilefrina con una contracción dosis dependiente, siendo la pD_2 de $1,2 \pm 0,08 \times 10^{-7}$ M, y el efecto máximo de $4,1 \pm 0,44$ gr. Las arterias sin endotelio presentaron una pD_2 comparable, y una contracción máxima algo menor (8 %) que los controles, pero no siendo esta diferencia, estadísticamente significativa (Tabla VIII y Figura 7).

Al realizar la curva dosis respuesta de fenilefrina en arterias pulmonares, en presencia de prazosín (un bloqueante específico α_1 -adrenérgico) a la concentración de 10^{-6} M, se produjo un desplazamiento paralelo de la curva, de 82 veces hacia la derecha. En cambio, la yohimbina (un bloqueante específico α_2 - adrenérgico) a una concentración de 10^{-6} M, no modificó la respuesta de las arterias pulmonares a la fenilefrina (Tabla IX y Figura 8).

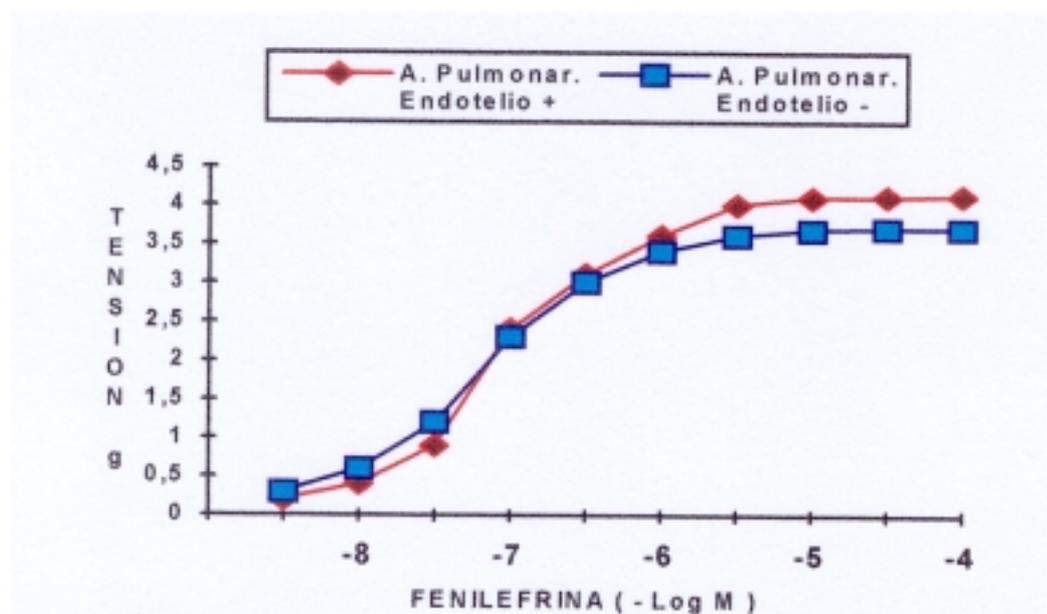


Figura 7. Respuesta contráctil (gr.) de arterias pulmonares, con endotelio (rombos rojos) y sin endotelio (cuadrados azules), a la fenilefrina (3×10^{-8} - 10^{-4} M).

Art. PULMONAR	pD₂	Efecto Máximo	Contracción Estable
	(M)	(gr.)	(min.)
CON ENDOTELIO	$1,2 \pm 0,08 \times 10^{-7}$	$4,1 \pm 0,44$	> 70
SIN ENDOTELIO	$1,1 \pm 0,06 \times 10^{-7}$	$3,9 \pm 0,64$	> 70

Tabla VIII. Valores de la pD₂, efecto contráctil máximo y duración de la contracción estable inducida con fenilefrina (3×10^{-8} - 10^{-4} M), sobre arterias pulmonares con y sin endotelio.

<u>Art. PULMONAR</u>	p D₂	Efecto
	(M)	(gr.)
CONTROL	$1,2 \pm 0,08 \times 10^{-7}$	$4,1 \pm 0,44$
Con PRAZOSIN	$1,5 \pm 0,04 \times 10^{-5}$	$2,7 \pm 0,52$
Con YOHIMBINA	$1,1 \pm 0,05 \times 10^{-7}$	$3,1 \pm 0,62$
<u>Art. FEMORAL</u>		
CONTROL	$3,1 \pm 0,09 \times 10^{-7}$	$6,9 \pm 0,54$
Con PRAZOSIN	$7,1 \pm 0,06 \times 10^{-5}$	$5,1 \pm 0,36$
Con YOHIMBINA	$6,2 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	$5,9 \pm 0,31$

Tabla IX. Valores de la pD₂ (M) y el efecto contráctil máximo (gr.), de las curvas dosis - efecto para la fenilefrina, en arterias pulmonares y femorales, en ausencia (control) y en presencia de prazosín (10⁻⁶ M), o de yohimbina (10⁻⁶ M).

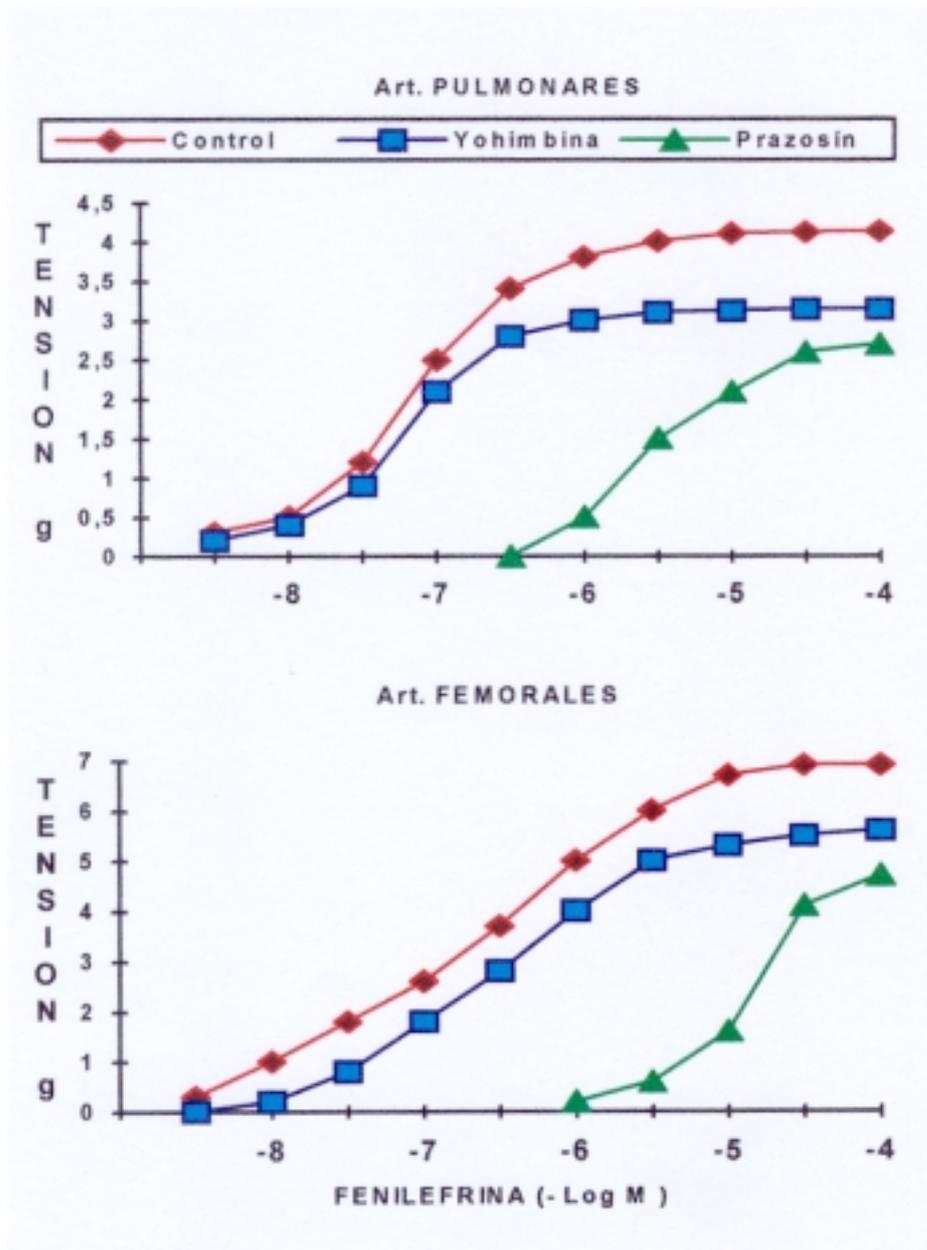


Figura 8. Respuesta contráctil de las arterias pulmonares (arriba) y femorales (abajo) a la fenilefrina (3×10^{-8} - 10^{-4} M), en ausencia de otros fármacos (control, rombos rojos), y en presencia de prazosín (triángulos verdes) y de yohimbina (cuadrados azules).

También se estudió el tiempo que permanecía estable la contracción inducida por fenilefrina, en arterias pulmonares con y sin endotelio, a una concentración submáxima de 10^{-5} M. Tanto en arterias desendotelizadas, como con endotelio íntegro, la contracción permanecía estable durante más de 70 minutos para las dosis antes señaladas.

Arteria Femoral

Las arterias con endotelio se contrajeron de forma dosis dependiente, siendo la pD_2 de $3,1 \pm 0,09 \times 10^{-7}$ M, y un efecto máximo de $6,9 \pm 0,54$ gr. . La sensibilidad, en términos de la ED_{50} , fue similar a la de las arterias pulmonares, y la contracción máxima fue un 30 % menor en las arterias pulmonares que en las femorales, diferencia estadísticamente significativa, con una ($p < 0,05$) (Tabla X y Figura 9).

En las arterias femorales desendotelizadas, la curva dosis - respuesta para la fenilefrina fue similar a la de las arterias con endotelio, sin diferencias estadísticamente significativas en la ED_{50} , ni en la contracción máxima.

Al realizar la curva dosis - respuesta de fenilefrina en arterias femorales en presencia de prazosín (10^{-6} M), se produjo un desplazamiento

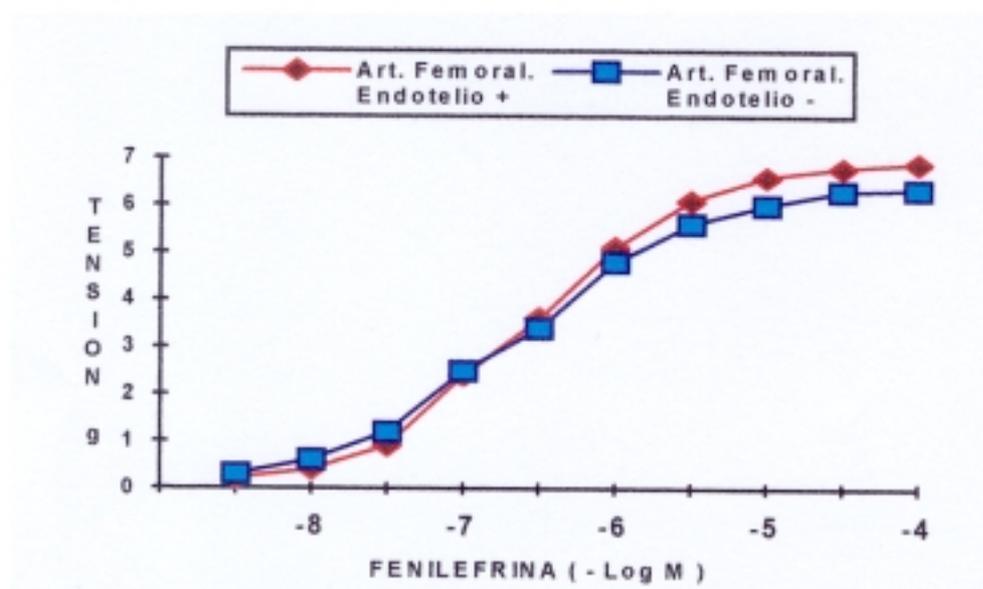


Figura 9. Respuesta contráctil de arterias femorales, con endotelio (rombos rojos) y sin endotelio (cuadrados azules), a la fenilefrina (3×10^{-8} - 10^{-4} M).

<u>Art. FEMORAL</u>	pD_2	Efecto Máximo	Contracción Estable
	(M)	(gr.)	(min.)
CON ENDOTELIO	$3,1 \pm 0,09 \times 10^{-7}$	$6,9 \pm 0,54$	> 70
SIN ENDOTELIO	$3 \pm 0,05 \times 10^{-7}$	$6,6 \pm 0,37$	> 70

Tabla X. Valores de la pD_2 , efecto contráctil máximo y duración de la contracción estable inducida con fenilefrina (3×10^{-8} - 10^{-4} M) sobre arterias femorales, con y sin endotelio.

paralelo hacia la derecha de la curva de 72 veces. En cambio, la yohimbina (10^{-6} M) sólo modificó levemente la respuesta de las arterias femorales a la fenilefrina, con un desplazamiento paralelo hacia la derecha de únicamente 2,2 veces (Tabla IX y Figura 8).

La duración de la contracción inducida por fenilefrina (10^{-5} M) de una forma estable en arterias femorales, con y sin endotelio, fue superior a 70 minutos en ambas situaciones.

Como resultado de todos estos estudios, decidimos utilizar para nuestros estudios posteriores de respuesta a sustancias vasodilatadoras, fenilefrina para precontraer los segmentos vasculares arteriales, tanto femorales como pulmonares, ya que fue el fármaco que mantenía una respuesta contráctil más estable y duradera, en ambos territorios vasculares estudiados. Se emplearon concentraciones en baño de 10^{-5} M, con lo que se obtenían respuestas contráctiles submáximas en arterias femorales y pulmonares.

1.4. Respuesta vascular a marcadores funcionales de la integridad endotelial

Para comprobar funcionalmente la presencia o ausencia de un endotelio íntegro en los segmentos arteriales en estudio, se emplearon dos sustancias, la acetilcolina y el trifosfato de adenosina, ambas sustancias basan su principio de acción, en estimular la producción y liberación de óxido nítrico endotelial, induciendo de esta forma una vasodilatación endotelio - dependiente en los segmentos arteriales previamente contraídos, cuando estos poseen un endotelio íntegro funcionante, y en cambio, no producen ningún efecto vasodilatador en los segmentos arteriales sin endotelio. Para estos estudios de respuesta vascular a los marcadores funcionales de integridad endotelial, se emplearon cinco conejos, tres machos y dos hembras, de los que se obtuvieron un total de 60 preparaciones arteriales, la mitad pulmonares y la otra mitad femorales.

1.4.1. Respuesta vascular a la acetilcolina

Las arterias pulmonares y femorales, precontraídas con fenilefrina a una dosis de 10^{-5} M, una vez estabilizada la contracción, se pusieron en contacto con acetilcolina, para comprobar la integridad o no del endotelio. Antes de estas comprobaciones, se realizaron estudios preliminares, en los que obtuvimos, curvas dosis-respuesta a la acetilcolina (3×10^{-8} - 10^{-4} M),

para estudiar el efecto de este fármaco, en ambos territorios vasculares, con y sin endotelio.

Arteria Pulmonar

El tono activo inducido por la fenilefrina (10^{-5} M) en arterias pulmonares con endotelio presentó una media de $3,2 \pm 0,49$ gr; y en arterias sin endotelio, fue de $3,1 \pm 0,42$ gr.

La acetilcolina produjo relajación dosis dependiente en las arterias pulmonares con endotelio, a una concentración comprendida entre (3×10^{-8} - 10^{-6} M), consiguiendo una relajación máxima del $65 \% \pm 8 \%$, y una pD_2 de $2,2 \pm 0,08 \times 10^{-7}$ M; sin embargo, dosis superiores a 10^{-6} M, inducían contracción en los segmentos arteriales pulmonares con endotelio íntegro.

Asimismo, en las arterias pulmonares con endotelio, tratadas con el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, L - NA, veinte minutos antes de la contracción con fenilefrina, a una dosis en baño de 10^{-5} M, la relajación inducida por la acetilcolina fue mucho menor que en las arterias no tratadas, con una relajación del $23 \pm 5 \%$ en los segmentos tratados con L - NA, frente al $65 \% \pm 8 \%$ de las arterias sin L - NA y con endotelio íntegro; este efecto se conseguía revertir, mediante la administración de L-arg (10^{-5} M).

Por el contrario, las arterias pulmonares desendotelizadas no presentaban cambios en su contracción o estos eran mínimos, no alcanzando más del $14 \% \pm 4 \%$ de vasodilatación sobre la contracción previa con fenilefrina.(Figura 10 y Tabla XI)

Arteria Femoral

La acetilcolina produjo relajación dosis dependiente en las arterias femorales con endotelio, para todas las concentraciones empleadas (3×10^{-8} - 10^{-4} M), sin presentarse en ningún momento efectos vasoconstrictores, mostrando una relajación máxima del $96 \% \pm 3 \%$, y una pD_2 de $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M.

La adición de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, L - NA, al baño de órganos, 20 minutos antes de la realización de la curva dosis respuesta de acetilcolina, en los segmentos femorales con endotelio, inhibía la vasodilatación inducida por acetilcolina, consiguiéndose un efecto vasodilatador máximo de sólo el $22 \% \pm 4 \%$. Esta inhibición de la respuesta a la acetilcolina se conseguía revertir mediante la administración de L - arginina (10^{-5} M), el precursor de la síntesis de óxido nítrico, que por tanto, revierte el bloqueo por competición de sustrato de la síntesis de óxido nítrico realizado con el L - NA.

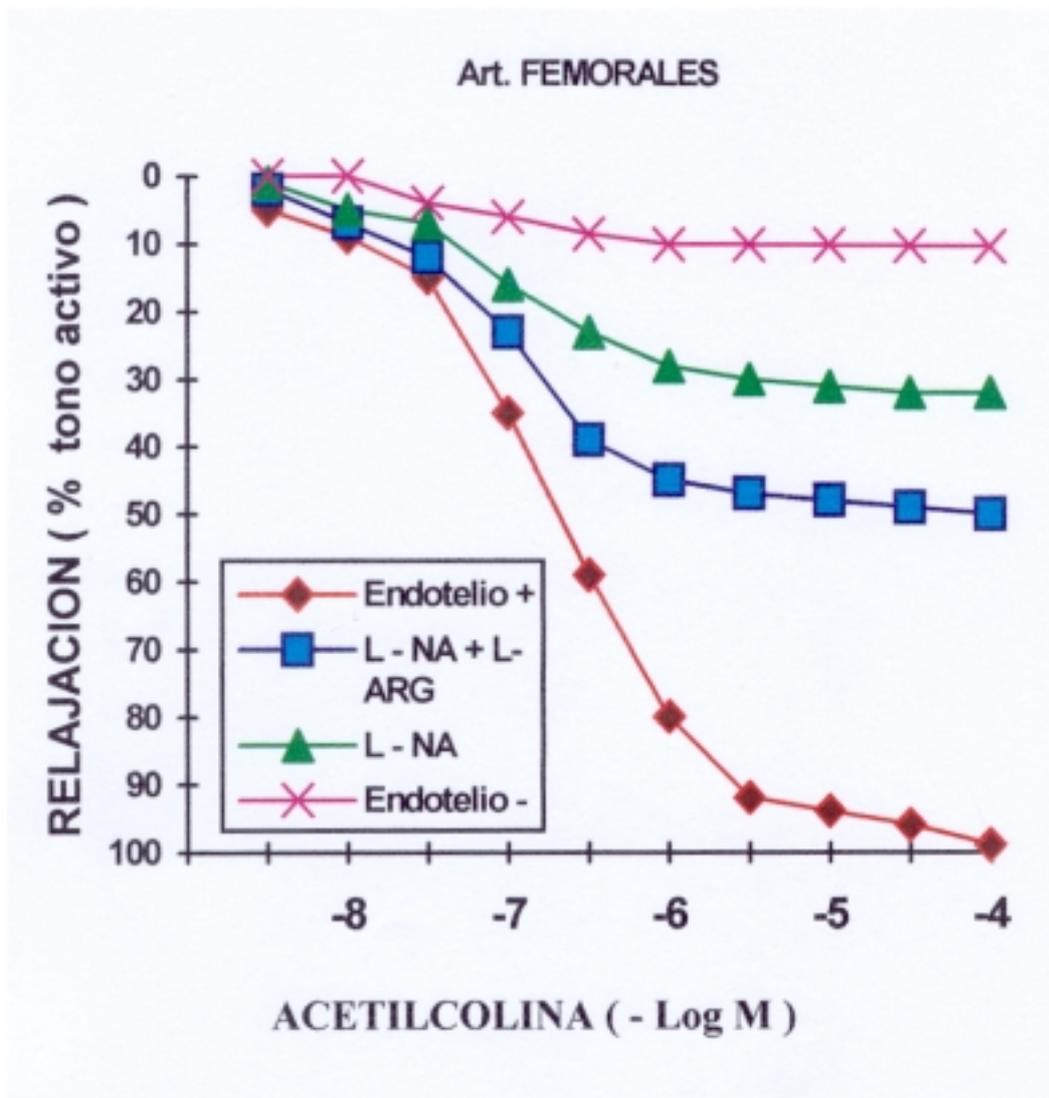


Figura 11. Efectos de la acetilcolina en arterias femorales con endotelio (rombos rojos), sin endotelio (aspas rosas), arterias intactas con L - NA (10^{-5} M) (triángulos verdes), y arterias intactas con L-NA más L-arginina (10^{-5} M) (cuadrados azules).

<u>Art. PULMONAR</u>	pD ₂ (M)	RELAJACION (% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$2,2 \pm 0,08 \times 10^{-7}$	65 ± 8
L - NA	$3,2 \pm 0,05 \times 10^{-7}$	23 ± 5
L - NA + L - Arginina	$2,8 \pm 0,06 \times 10^{-7}$	50 ± 6
SIN ENDOTELIO	$3,1 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	14 ± 4

Tabla XI. Valores de la pD₂ (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para la acetilcolina, en arterias pulmonares con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L - NA (10⁻⁵ M) y de L - NA añadiendo después L - arginina (10⁻⁵ M).

Por el contrario, la acetilcolina no tuvo efectos vasodilatadores en los segmentos vasculares femorales sin endotelio, no modificando la curva de contracción con fenilefrina más de un $7 \% \pm 4 \%$, con respecto a la contracción máxima estable conseguida. (Figura 11 y Tabla XII)

1.4.2. Respuesta vascular al trifosfato de adenosina (ATP)

La acetilcolina produce en las arterias pulmonares de conejos una respuesta dual; por un lado, estimula la producción de óxido nítrico, produciendo vasodilatación, pero en dosis crecientes también produce vasoconstricción, lo que hace que estos efectos contrapuestos puedan enmascararse entre sí. Por ello no es conveniente utilizar la acetilcolina como marcador funcional de la integridad del endotelio en arterias pulmonares de conejos.

Debido a la necesidad de buscar otro marcador de la integridad endotelial para la circulación pulmonar de conejos, estudiamos la respuesta vascular al trifosfato de adenosina (ATP) en segmentos arteriales pulmonares y femorales, precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), ya que el ATP estimula los receptores purinérgicos endoteliales, lo que provoca una síntesis y liberación de NO, produciendo una vasodilatación dependiente del endotelio.

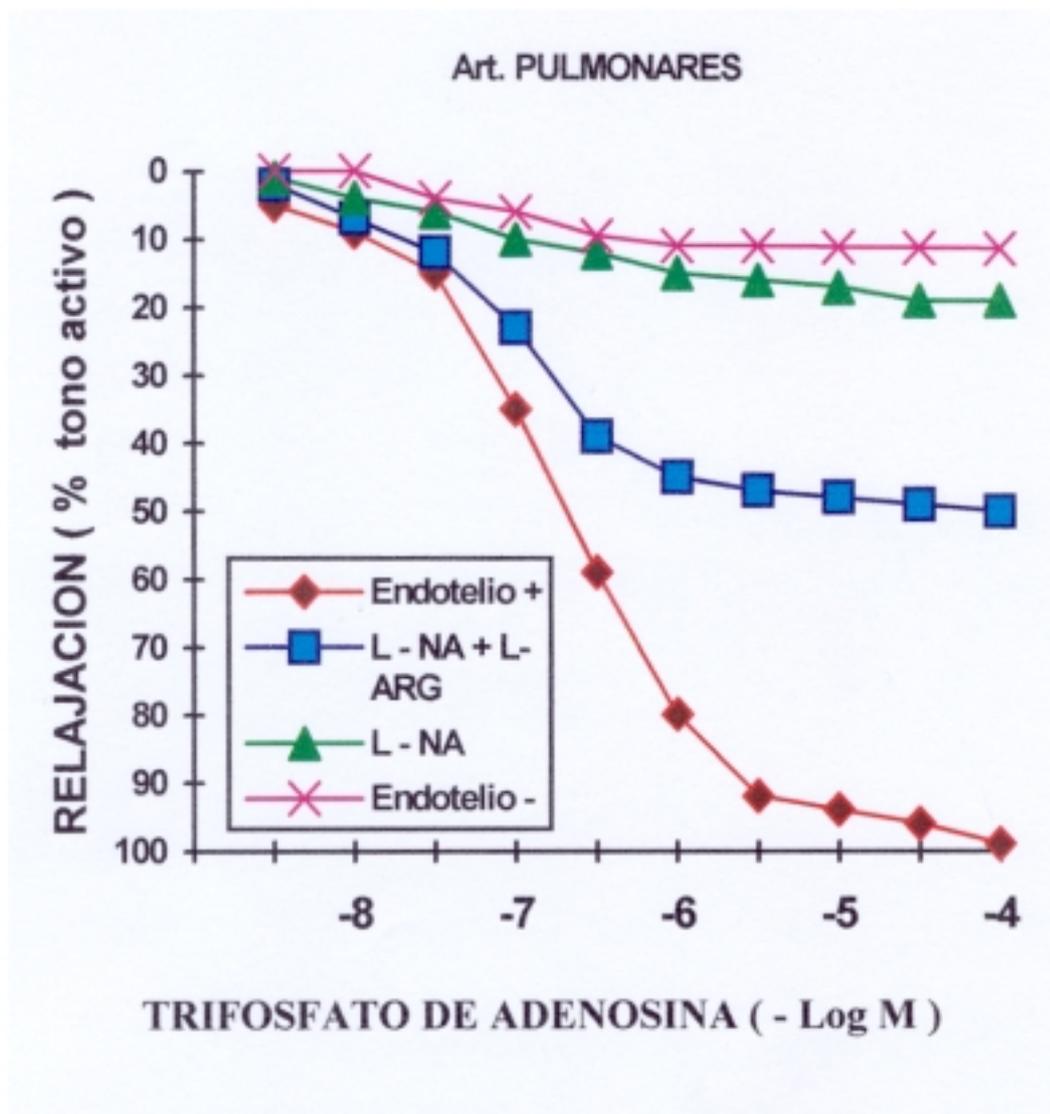


Figura 12. Efectos de ATP en arterias pulmonares con endotelio (rombos rojos), sin endotelio (aspas rosas), arterias intactas con L - NA (10^{-5} M) (triángulos verdes), y arterias intactas con L-NA (10^{-5} M) más L-arginina (10^{-5} M) (cuadrados azules).

<u>Art. FEMORALES</u>	pD_2 (M)	RELAJACION (% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$1,2 \pm 0,1 \times 10^{-7}$	96 ± 3
L - NA	$1,9 \pm 0,06 \times 10^{-7}$	32 ± 4
L - NA + L - Arginina	$1,7 \pm 0,07 \times 10^{-7}$	66 ± 8
SIN ENDOTELIO	$2,3 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	7 ± 4

Tabla XII. Valores de la pD_2 (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para la acetilcolina en arterias femorales, con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L - NA (10^{-5} M), y de L - NA, añadiendo después L - arginina (10^{-5} M).

Arteria Pulmonar

El ATP (10^{-9} M - 10^{-4} M) produjo relajación, dosis dependiente, de las arterias pulmonares con endotelio (pD_2 de $9,6 \pm 0,08 \times 10^{-8}$ M), mientras que en las arterias desendotelizadas la respuesta fue nula o estaba muy disminuída.

En las arterias pulmonares tratadas con el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L - NA), la relajación inducida por el ATP fue mucho menor que en las arterias no tratadas (relajación máxima del tono activo del 16 ± 4 % con L - NA; frente al 96 ± 4 % sin L - NA). Este efecto revertía, mediante la administración de L - arginina (10^{-5} M) a las arterias previamente tratadas con L - NA. (Figura 12 y Tabla XIII)

Arteria Femoral

El ATP, al igual que la acetilcolina, produjo relajación dosis dependiente de las arterias femorales con endotelio, y esta respuesta era prácticamente nula en estas mismas arterias sin endotelio.

El tratamiento con L - NA (10^{-5} M) modificó, significativamente ($p < 0,01$) la respuesta al ATP de arterias femorales con endotelio, disminu-

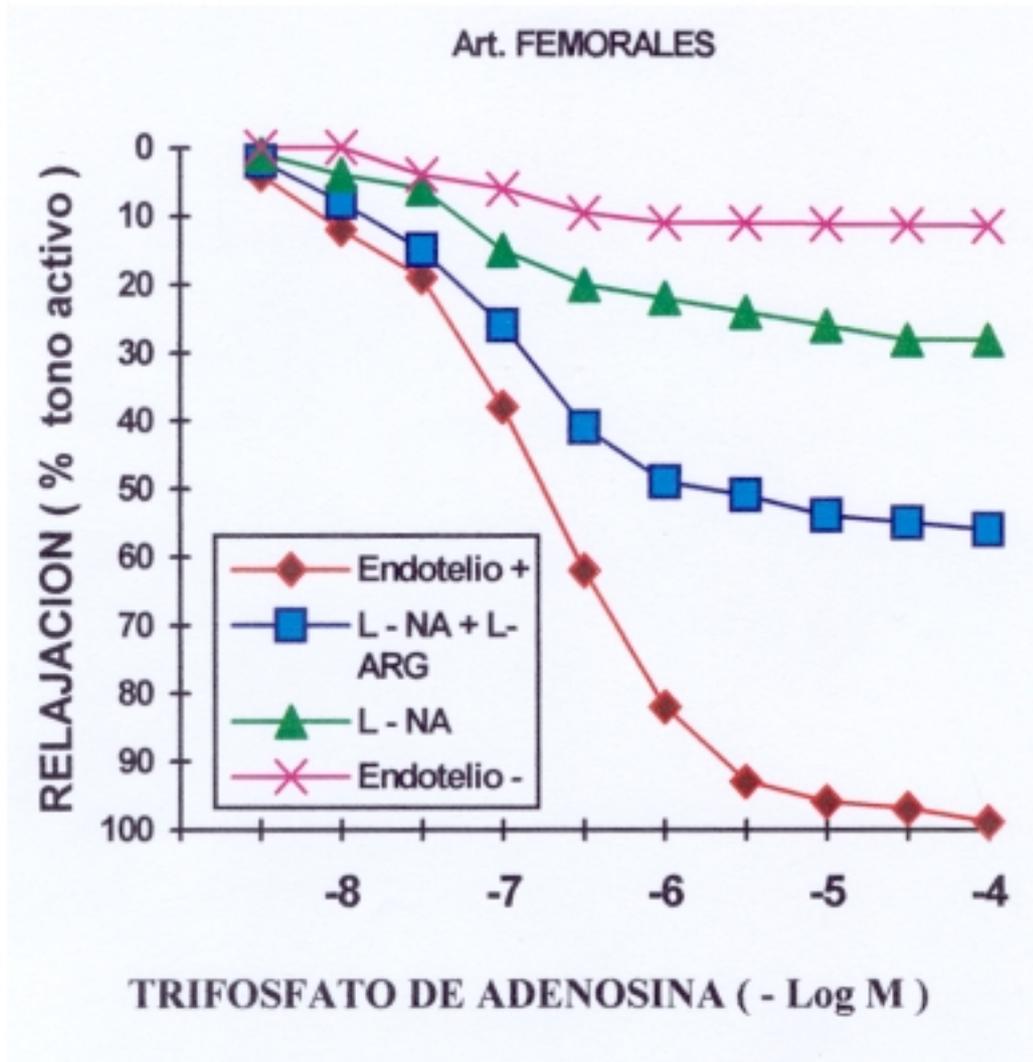


Figura 13. Efectos del ATP en arterias femorales con endotelio (rombos rojos), sin endotelio (aspas rosas), arterias intactas con L-NA (10^{-5} M) (triángulos verdes), y arterias intactas con L-NA (10^{-5} M) más L-arginina (10^{-5} M) (cuadrados azules).

<u>Art. PULMONAR</u>	p D₂ (M)	RELAJACION (% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$9,6 \pm 0,08 \times 10^{-8}$	96 ± 4
L - NA	$6,1 \pm 0,06 \times 10^{-7}$	16 ± 4
L - NA + L - Arginina	$3,4 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	56 ± 7
SIN ENDOTELIO	$3,3 \pm 0,05 \times 10^{-7}$	9 ± 4

Tabla XIII. Valores de la pD₂ (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para el ATP, en arterias pulmonares con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L - NA (10⁻⁵ M), y de L - NA, añadiendo después L - arginina (10⁻⁵ M).

yendo la vasodilatación máxima inducida por el ATP, que pasó del 97 ± 3 % sin L - NA, a un 24 ± 5 % con L - NA. Si a continuación administráramos L-arginina (10^{-5} M), se revertía parcialmente el efecto antagonista del L-NA sobre la síntesis del óxido nítrico (Figura 13 y Tabla XIV).

1.5. Curvas dosis - respuesta de la milrinona

Antes de obtener las curvas dosis - respuesta con la milrinona, y dado que este fármaco precisa de un pH muy bajo para su disolución en agua, tuvimos que realizar estudios preliminares, para valorar los posibles efectos de los excipientes empleados. Se utilizó dos soluciones de la milrinona; por un lado la milrinona pura, en polvo, que se disolvió en agua bidestilada, acidificando el medio con ClH, hasta conseguir disolver la milrinona, lo que se obtuvo al llegar a un pH de 2. También se utilizó una sal de la milrinona, el lactato de milrinona, ya que la esterificación de la milrinona con el ácido láctico aumenta su hidrosolubilidad, lo que permite que venga presentada en una solución acuosa, con dextrosa 4,7 gr. / ml. , y un pH de 4.

Por tanto, realizamos estudios de los efectos de ambos excipientes, en arterias pulmonares y femorales, con y sin endotelio, precontraídas con fenilefrina (10^{-5} M), administrando la misma cantidad acumulativa de excipiente, con los mismos intervalos de tiempo, y de igual forma que si

Resultados

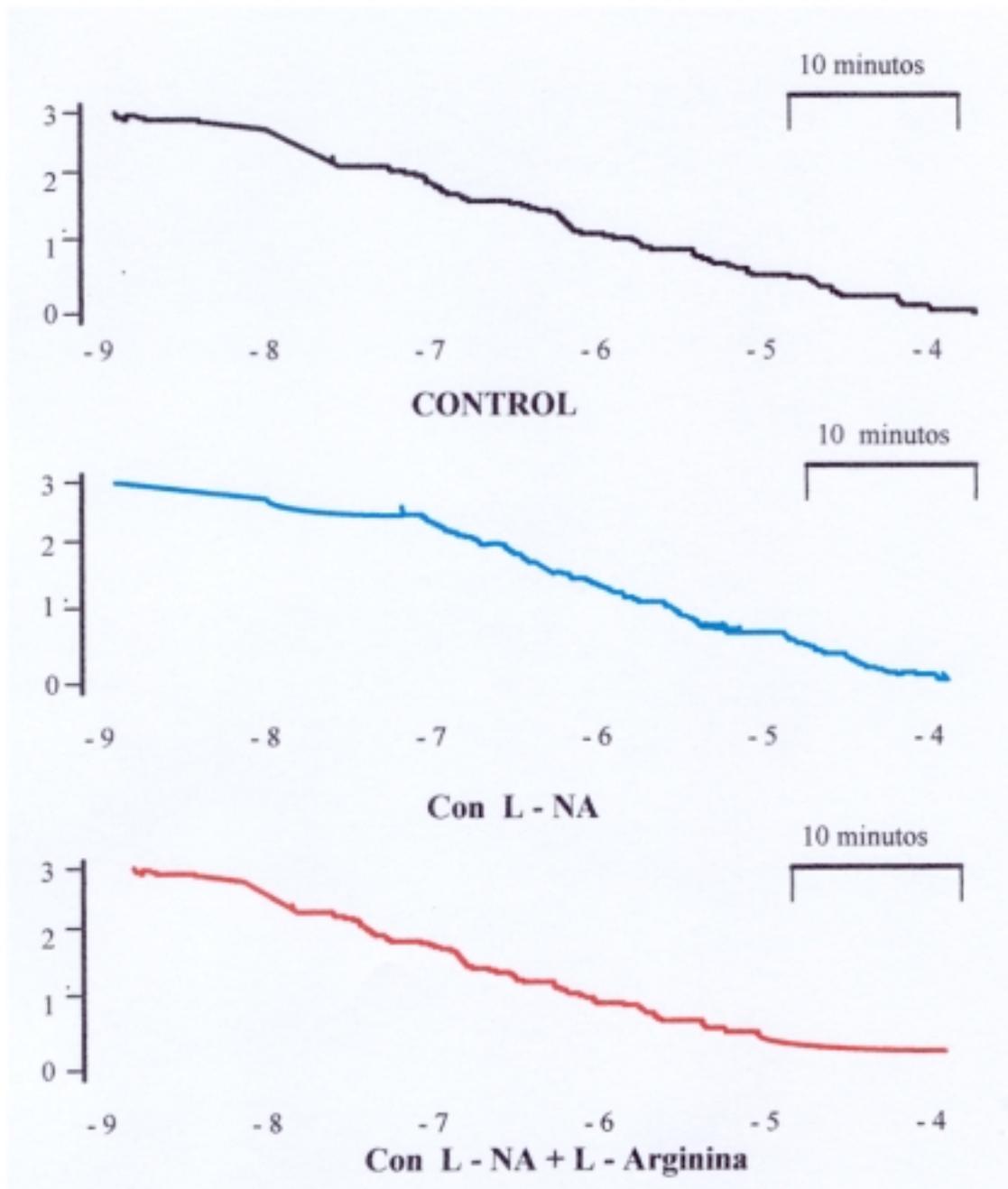


Figura 14. Curvas dosis-efecto de la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4}) sobre arterias pulmonares con endotelio íntegro en ausencia de otros fármacos (control negro), previamente tratadas con L-NA (azul), y con L-NA y L-arginina (rojo).

<u>Art. FEMORALES</u>	p D ₂ (M)	RELAJACION (% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$9,8 \pm 0,06 \times 10^{-8}$	97 ± 3
L - NA	$4,3 \pm 0,08 \times 10^{-7}$	24 ± 5
L - NA + L - Arginina	$5,2 \pm 0,07 \times 10^{-7}$	58 ± 9
SIN ENDOTELIO	$2,9 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	8 ± 6

Tabla XIV. Valores de la pD₂ (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para el ATP, en arterias femorales con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L-NA (10⁻⁵ M), y de L - NA, añadiendo posteriormente L - arginina (10⁻⁵ M).

fuera una curva de dosis respuesta con la milrinona, analizando disminuciones del pH del baño , y posibles efectos vasodilatadores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), nada más añadir las dosis acumulativas del excipiente con pH de 2, disminuyendo el pH del baño una media de $0,5 \pm 0,2$ puntos. Sin embargo, esta disminución del pH del baño no tenía efectos vasodilatadores significativos ($p > 0,05$) sobre la respuesta vasoconstrictora de la fenilefrina, que pudieran enmascarar la respuesta posterior a la milrinona.

Por el contrario, el excipiente en el que viene disuelto el lactato de milrinona, con un pH de 4, provocó disminuciones, no significativas ($p > 0,05$), en el pH de los baños, con una media de $0,2 \pm 0,2$ puntos. Estas pequeñas disminuciones del pH del baño, tras la administración de dicho excipiente, no produjeron ninguna respuesta vascular, manteniéndose sin cambios la vasoconstricción por fenilefrina.

1.5.1. Efectos de la milrinona sobre las arterias pulmonares con endotelio

Se estudiaron 36 segmentos de arterias pulmonares con endotelio, procedentes de 12 conejos, 7 machos y 5 hembras, que se estabilizaron en una tensión basal de 1500 mg. durante 120 minutos, y que se precontraieron

con fenilefrina (10^{-5} M). Se realizó, una vez estabilizada de nuevo la contracción, una curva dosis - respuesta a la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4} M), primero con lactato de milrinona, y a continuación con solución acuosa de la milrinona pura.

El tono activo inducido por la fenilefrina (10^{-5} M) en arterias pulmonares con endotelio presenta una media de $3,2 \pm 0,42$ gr. En estas arterias precontraídas, la milrinona pura y el lactato de milrinona producen una relajación dosis dependiente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las curvas dosis respuesta realizadas con la milrinona pura y con lactato de milrinona, ni en el efecto relajador máximo, ni en la dosis eficaz cincuenta; siendo el efecto relajador máximo del $96 \pm 4\%$ del tono activo, y presentando una pD_2 de $2,8 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M.

No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en las curvas dosis respuesta de la milrinona (ni la relajación máxima obtenida, ni en la ED_{50}) en segmentos arteriales pulmonares con endotelio, entre los animales macho y hembra.

Asimismo, en estas arterias pulmonares con endotelio, la administración de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico L-NA (10^{-5} M), treinta minutos antes de la realización de una nueva curva de la milrinona, no sólo no disminuyó la relajación máxima, sino que además la pD_2 fue discretamente menor (pD_2 de $9,1 \pm 0,09 \times 10^{-8}$ M), siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p < 0,05$). Esto indica que la relajación que

produce la milrinona, no sólo no es dependiente de la producción de óxido nítrico, sino que además el bloquear la síntesis de NO, potencia sus efectos vasodilatadores, en segmentos arteriales pulmonares de conejo con endotelio. La administración de L - arginina (10^{-5} M) a las arterias previamente tratadas con L - NA, revertía este efecto potenciador de la relajación de la milrinona. (Figura 14 y 15, y Tabla XV)

1.5.2. Efectos de la milrinona sobre las arterias pulmonares sin endotelio

Preparamos otros 36 segmentos arteriales pulmonares, a los que se les retiró el endotelio, mediante un alambre grueso (200 μ m) y de superficie suavemente rugosa, sobre el que se hacía girar los cilindros vasculares. Estas preparaciones procedían de 12 conejos, 7 machos y 5 hembras.

Estos segmentos arteriales se estabilizaron en una tensión basal de 1500 mg. durante 120 minutos, y a continuación se precontrajeron con fenilefrina (10^{-5} M), obteniendo un tono activo inducido, que presentó una media de $3,2 \pm 0,51$ gr.

Las curvas dosis - respuesta realizadas con la milrinona y con lactato de milrinona mostraron una relajación dosis dependiente, presentando un efecto relajador máximo del 96 ± 5 % del tono activo previamente

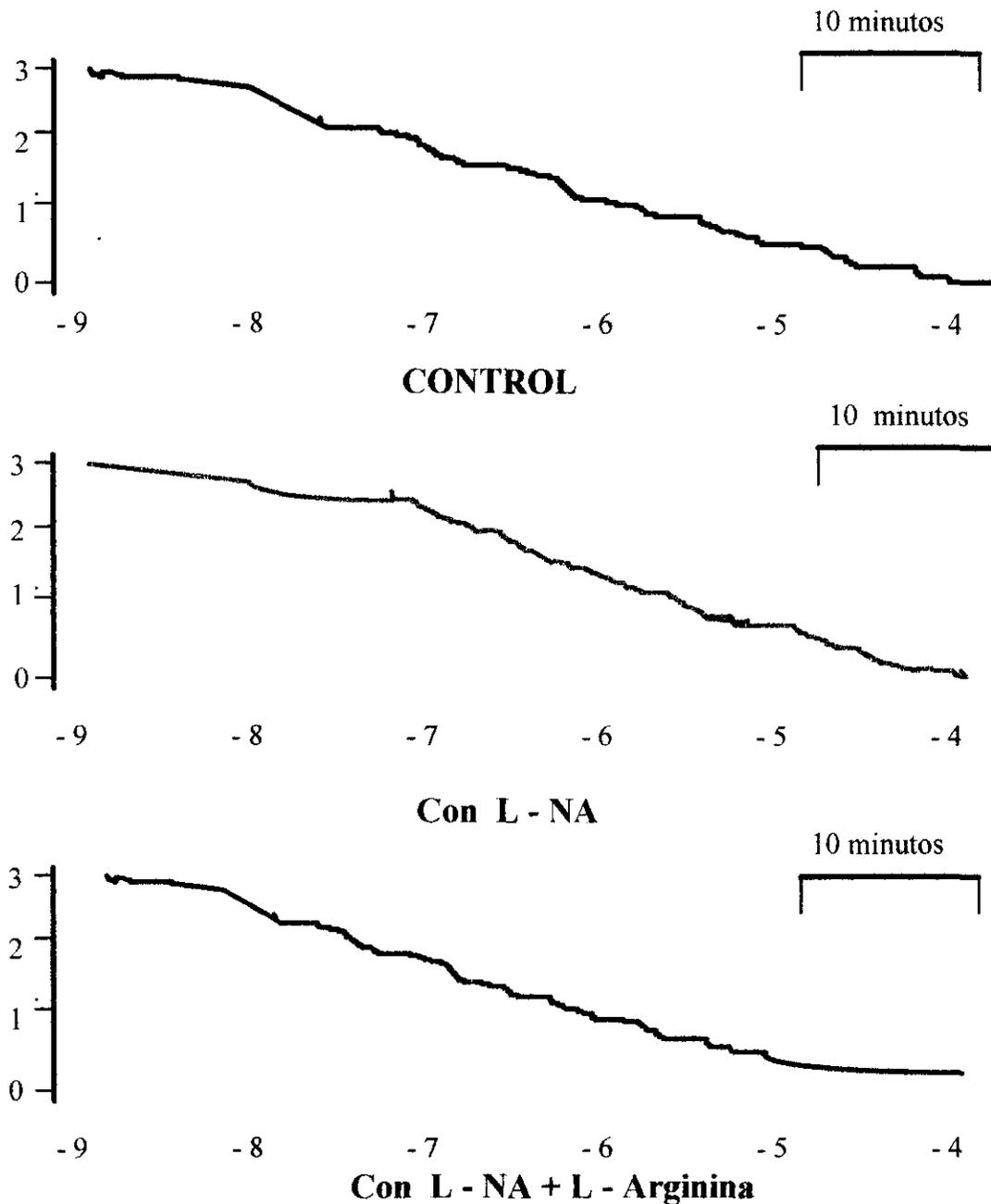


Figura 14. Curvas dosis-efecto de la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4}) sobre arterias pulmonares con endotelio íntegro en ausencia de otros fármacos (control negro), previamente tratadas con L-NA (azul), y con L-NA y L-arginina (rojo).

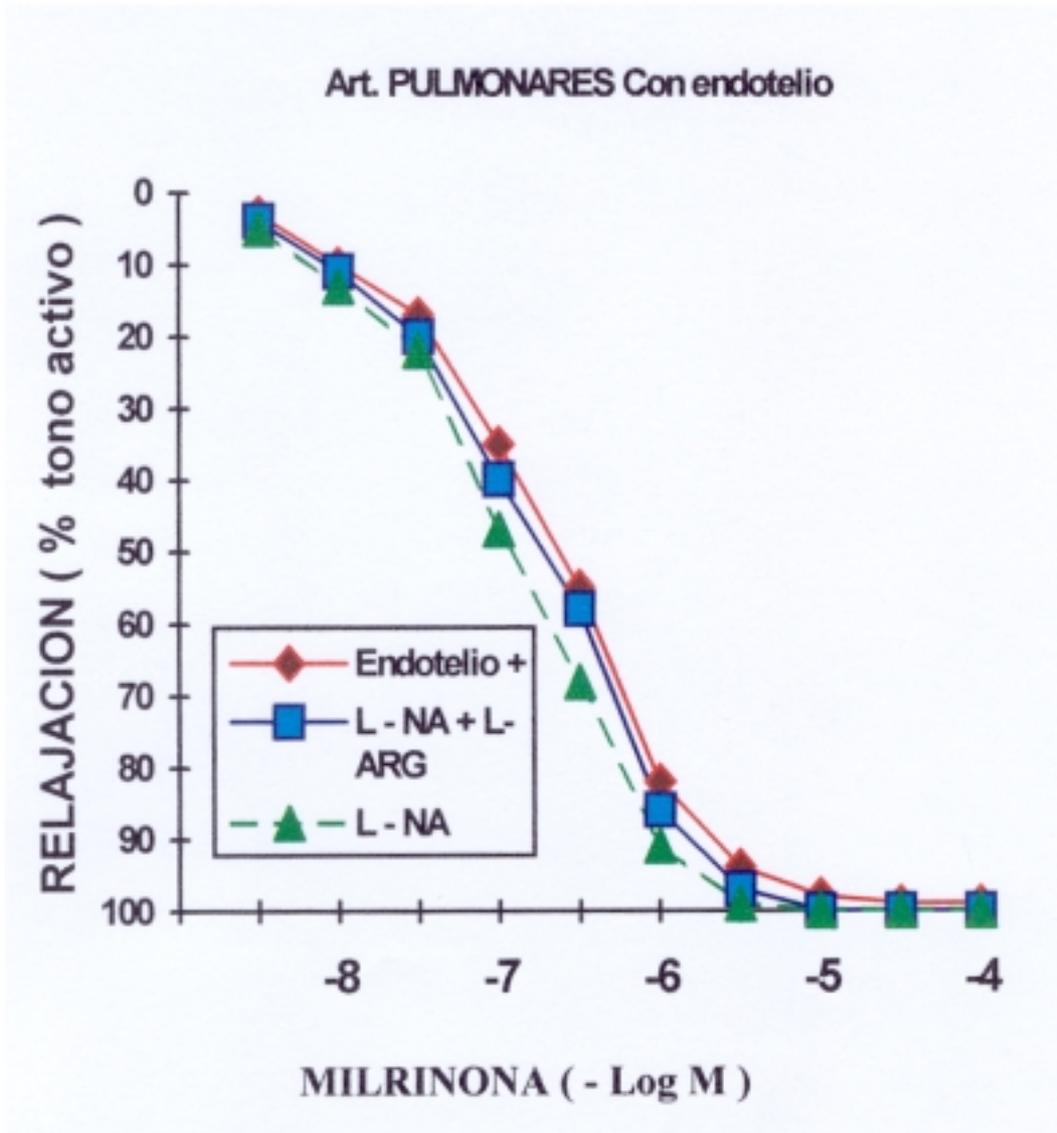


Figura 15. Efectos de la milrinona en arterias pulmonares con endotelio, sin ningún otro fármaco (rombos rojos), arterias intactas pretratadas con L - NA (10^{-5} M) (triángulos verdes), y arterias intactas con L - NA más L - arginina (10^{-5} M) (cuadrados azules).

<u>Art. PULMONARES</u>	pD_2 (M)	RELAJACION (% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-7}$	96 ± 4
L - NA	$9,1 \pm 0,09 \times 10^{-8}$	99 ± 1
L - NA + L - Arginina	$1,2 \pm 0,06 \times 10^{-7}$	97 ± 3
SIN ENDOTELIO	$1,3 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	96 ± 5

Tabla XV. Valores de la pD_2 (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para la milrinona, en arterias pulmonares con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L - NA (10^{-5} M), y de L - NA, añadiendo posteriormente L - arginina (10^{-5} M).

conseguido, y con una pD_2 de $1,3 \pm 0,07 \times 10^{-7}$ M . Esto muestra que la relajación que la milrinona produce sobre segmentos arteriales pulmonares no es endotelio dependiente.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la respuesta vascular obtenida con la milrinona y con lactato de milrinona, tampoco existieron diferencias entre las curvas dosis respuesta de segmentos arteriales pulmonares de animales macho y los de animales hembra (Figuras 16 y 17, y Tabla XV).

1.5.3. Efectos de la milrinona sobre las arterias femorales con endotelio

Estudiamos los efectos de la milrinona y el lactato de milrinona en 36 segmentos arteriales femorales con endotelio íntegro, procedentes de 12 conejos, 7 machos y 5 hembras, que tras conseguir la estabilización en una tensión basal de 1500 mg., durante 45 minutos, se precontrajeron con fenilefrina (10^{-5} M), consiguiendo inducir un tono activo de $5,6 \pm 0,64$ gr.

Una vez estabilizada la contracción con fenilefrina, se realizaron las curvas dosis respuesta de la milrinona, a una concentración en baño, desde 3×10^{-8} , hasta 10^{-4} M, produciendo, tanto la milrinona como el lactato de

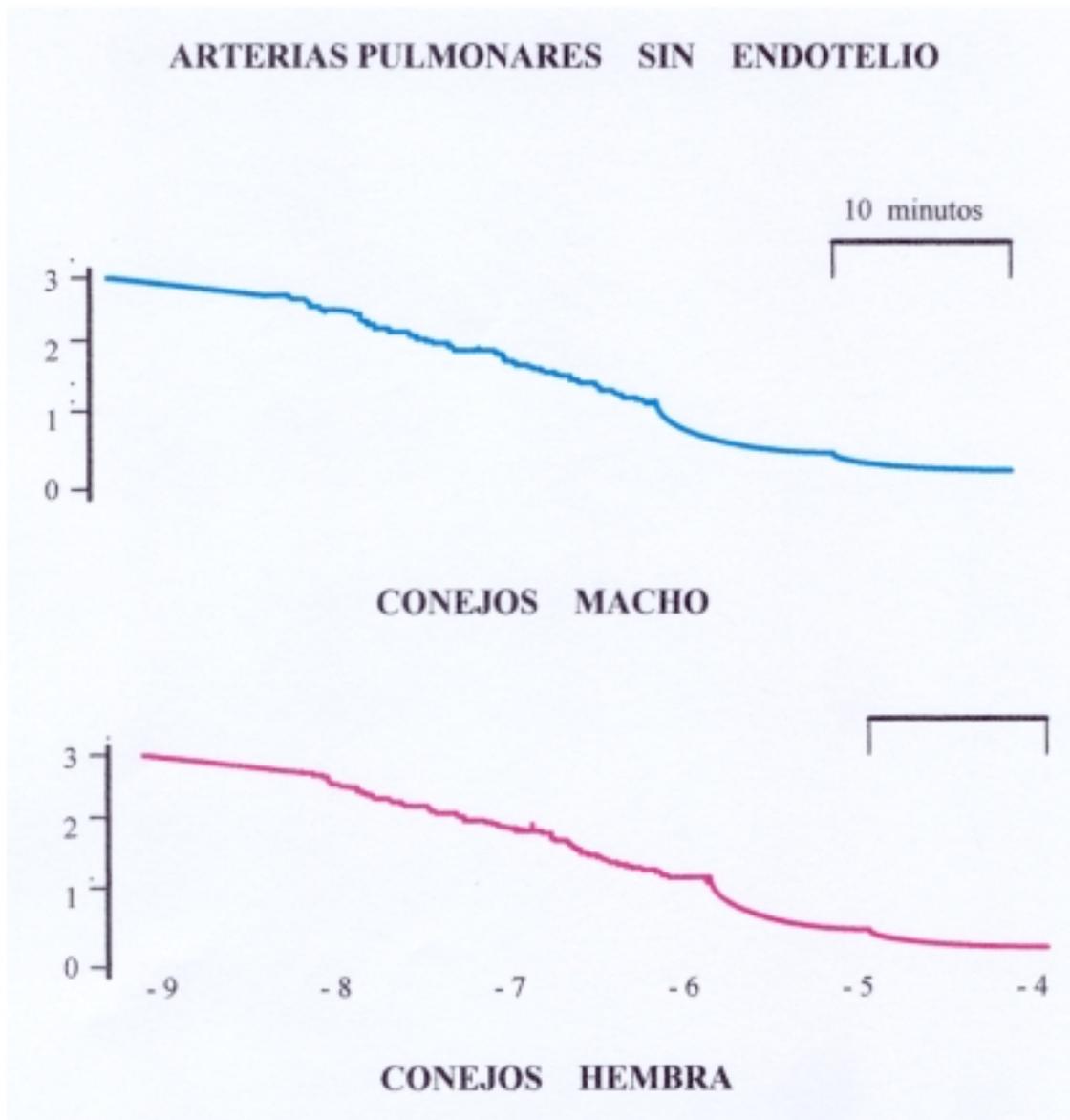


Figura 16. Efectos de la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4}) sobre arterias pulmonares sin endotelio, de conejos macho (azul), y de conejos hembra (rosa), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

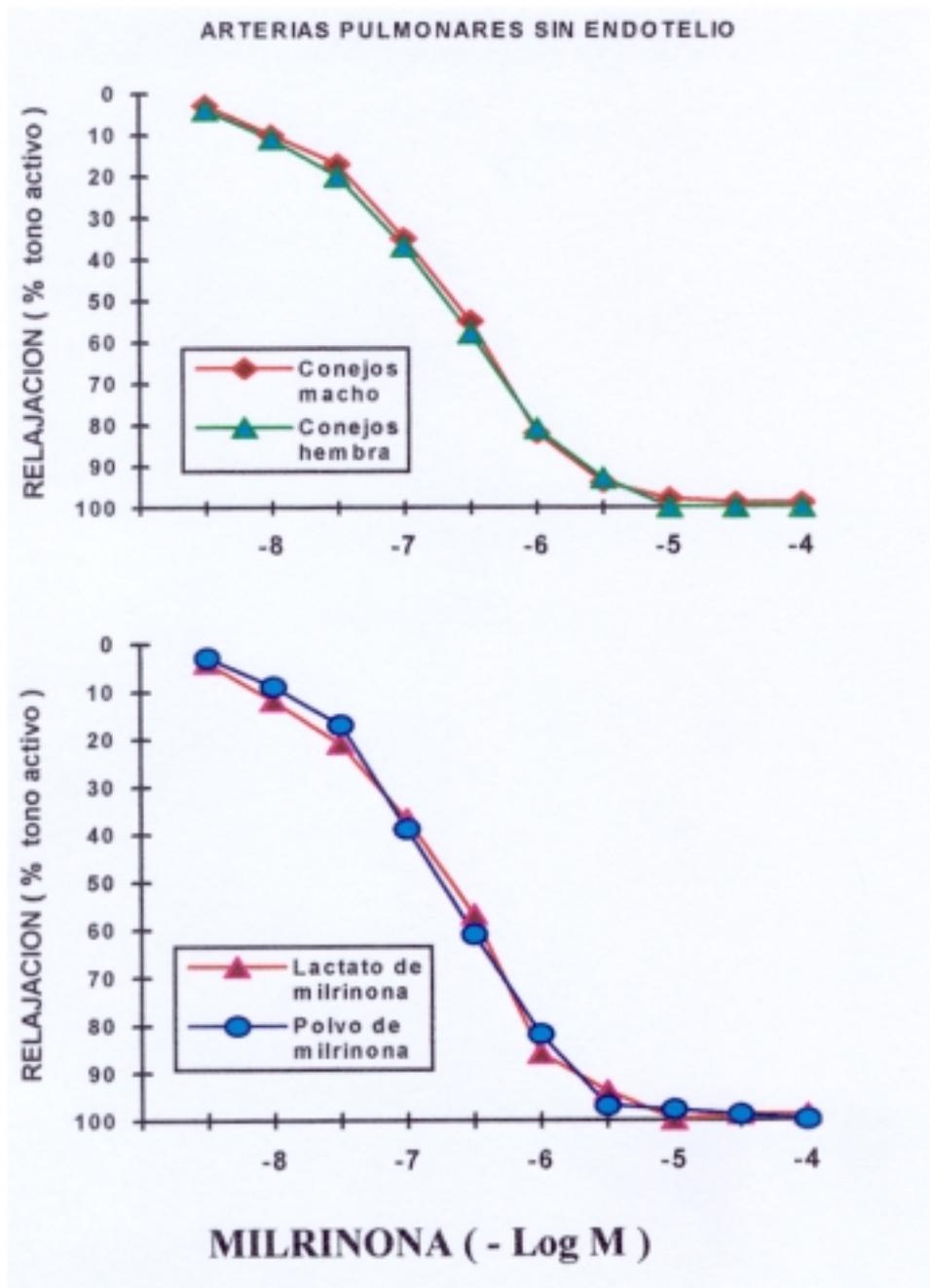


Figura 17. Efectos del lactato de milrinona (triángulos rosas), y de la milrinona en polvo (círculos azules), en arterias pulmonares sin endotelio, procedentes de conejos macho (rombos rojos), y de conejos hembra (triángulos verdes).

milrinona, una relajación dosis dependiente, y no presentando entre sí diferencias estadísticamente significativas, en el efecto relajador máximo, ni en la pD_2 . Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la respuesta vascular obtenida en segmentos arteriales procedentes de conejos machos, respecto a la de conejos hembras.

El conjunto de curvas dosis efecto realizadas en segmentos arteriales femorales con endotelio presentan un efecto relajador máximo del $95 \pm 4\%$ del tono activo conseguido previamente, y una pD_2 de $9,3 \pm 0,03 \times 10^{-7}M$; estos resultados se muestran en la Figura 18 y 19, y en la Tabla XVI.

Estas arterias femorales con endotelio íntegro, una vez realizadas las primeras curvas, se lavaban numerosas veces y tras comprobar nuevamente la integridad funcional del endotelio y de la capa muscular, se le administraba a la preparación un inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, el L - NA ($10^{-5} M$), treinta minutos antes de la realización de una nueva curva dosis efecto de la milrinona. El efecto relajador máximo de la milrinona no disminuyó por la presencia del L - NA, consiguiendo una relajación del $94 \% \pm 5 \%$; y la pD_2 presentó un valor de $2,1 \pm 0,04 \times 10^{-6} M$, no mostrando diferencias estadísticamente significativas, con las curvas dosis respuesta obtenidas en arterias femorales con endotelio y sin L - NA, lo que implica que el tratamiento con L - NA no modificó significativamente la respuesta a la milrinona, en las arterias femorales con endotelio íntegro. (Figuras 18 y 19, y Tabla XVI)

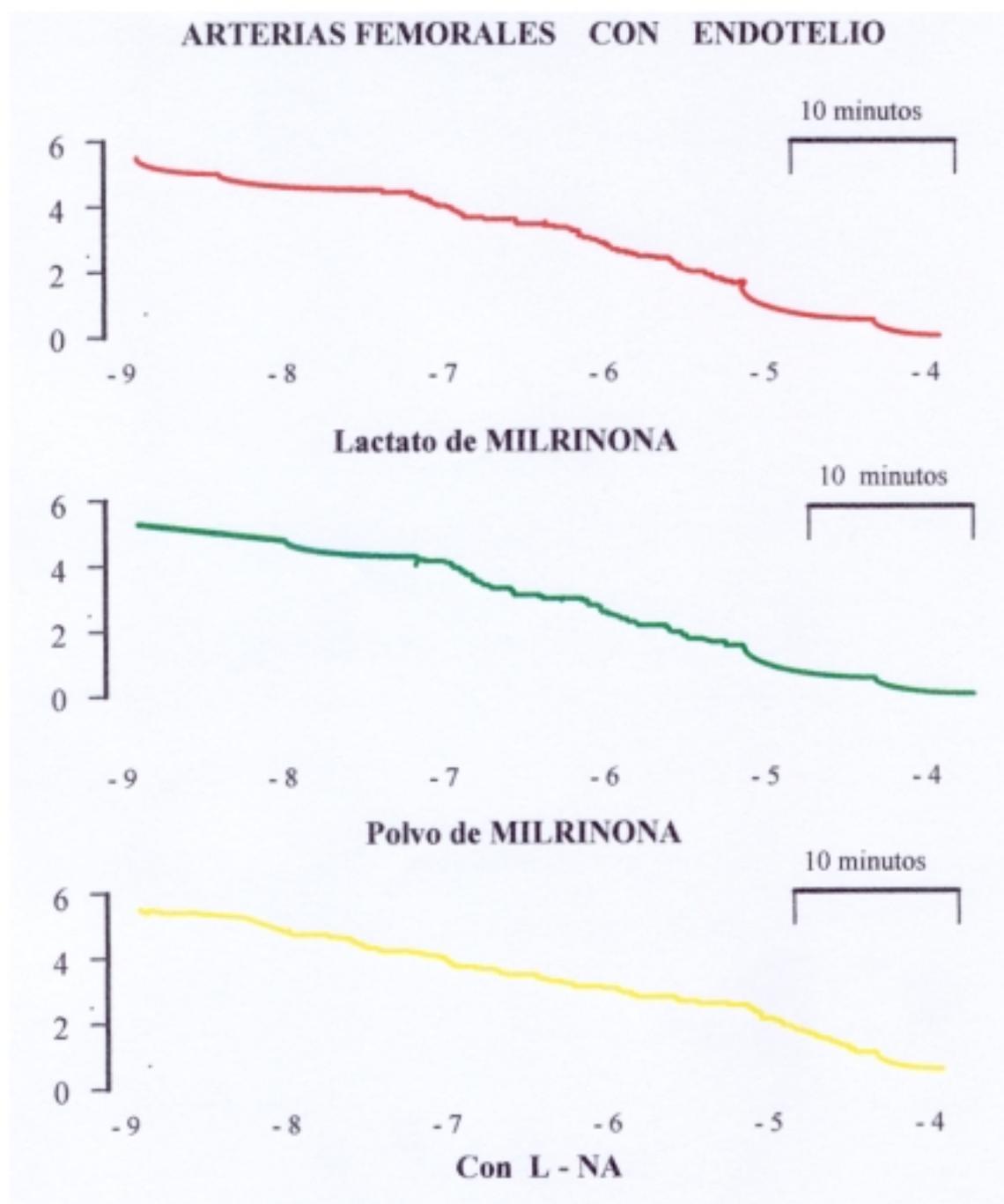


Figura 18. Efectos de la milrinona sobre arterias femorales con endotelio; curvas dosis efecto realizadas con lactato de milrinona (rojo), con polvo de la milrinona (verde), y en presencia de L - NA (amarillo).

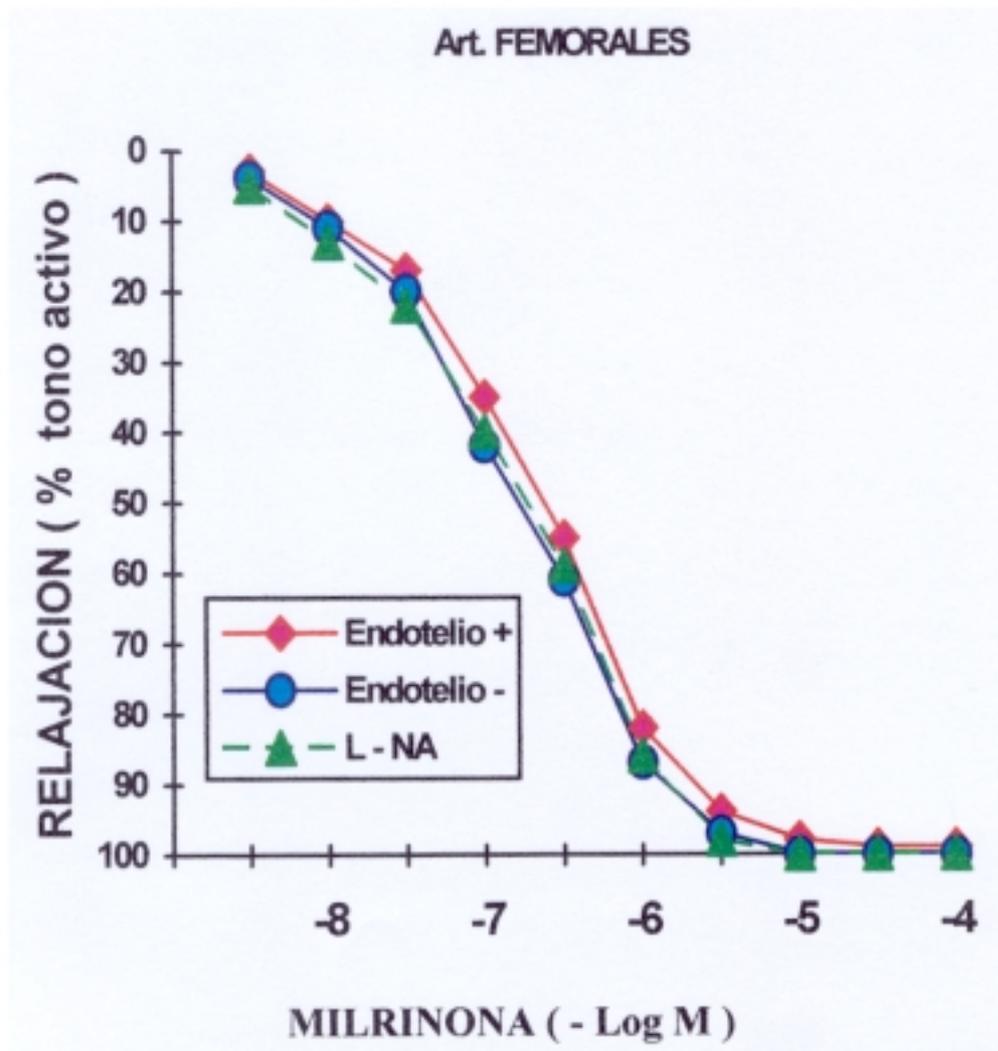


Figura 19. Efectos de la milrinona en arterias femorales con endotelio y sin ningún otro fármaco (rombos rojos), arterias intactas pretratadas con L - NA (10^{-5} M) (triángulos verdes), y arterias femorales sin endotelio (círculos azules).

<u>Art. FEMORALES</u>	pD₂	RELAJACION
	(M)	(% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$9,3 \pm 0,03 \times 10^{-7}$	95 ± 4
L - NA	$2,1 \pm 0,04 \times 10^{-6}$	94 ± 5
SIN ENDOTELIO	$1,1 \pm 0,06 \times 10^{-6}$	94 ± 4

Tabla XVI. Valores de la pD₂ (M) y la relajación máxima (%) de las curvas dosis-efecto para la milrinona, en arterias femorales con endotelio íntegro (control), sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L - NA (10⁻⁵ M).

1.5.4. Efectos de la milrinona sobre las arterias femorales sin endotelio

Desendotelizamos otros 36 segmentos arteriales femorales, insertándolos dentro de un alambre de superficie suavemente rugosa, y haciéndolos girar en ambos sentidos sobre el alambre. Estos segmentos procedían de 12 conejos, 7 machos y 5 hembras.

Estas arterias se estabilizaron durante 120 minutos, en una tensión basal de 1500 mg. , posteriormente se estimularon con fenilefrina (10^{-5} M), con lo que se consiguió un tono activo inducido que presentó una media de $5,4 \pm 0,42$ gr.

Las curvas dosis respuesta realizadas con la milrinona y con lactato de milrinona mostraron una relajación dosis dependiente, y presentaron un efecto relajador máximo del 94 ± 4 % del tono activo previamente conseguido, y una pD_2 de $1,1 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ M, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la pD_2 , ni en el efecto vasodilatador máximo, entre las curvas obtenidas de las arterias femorales con y sin endotelio, lo que indica que la vasodilatación producida por la milrinona en arterias femorales de conejo no depende de la presencia íntegra del endotelio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la respuesta vascular obtenida con la milrinona y con lactato de milrinona, y tampoco existieron diferencias entre las curvas dosis respuesta de segmentos arteriales femorales de animales macho, y los de animales hembra (Figura 20 y Tabla XVI).

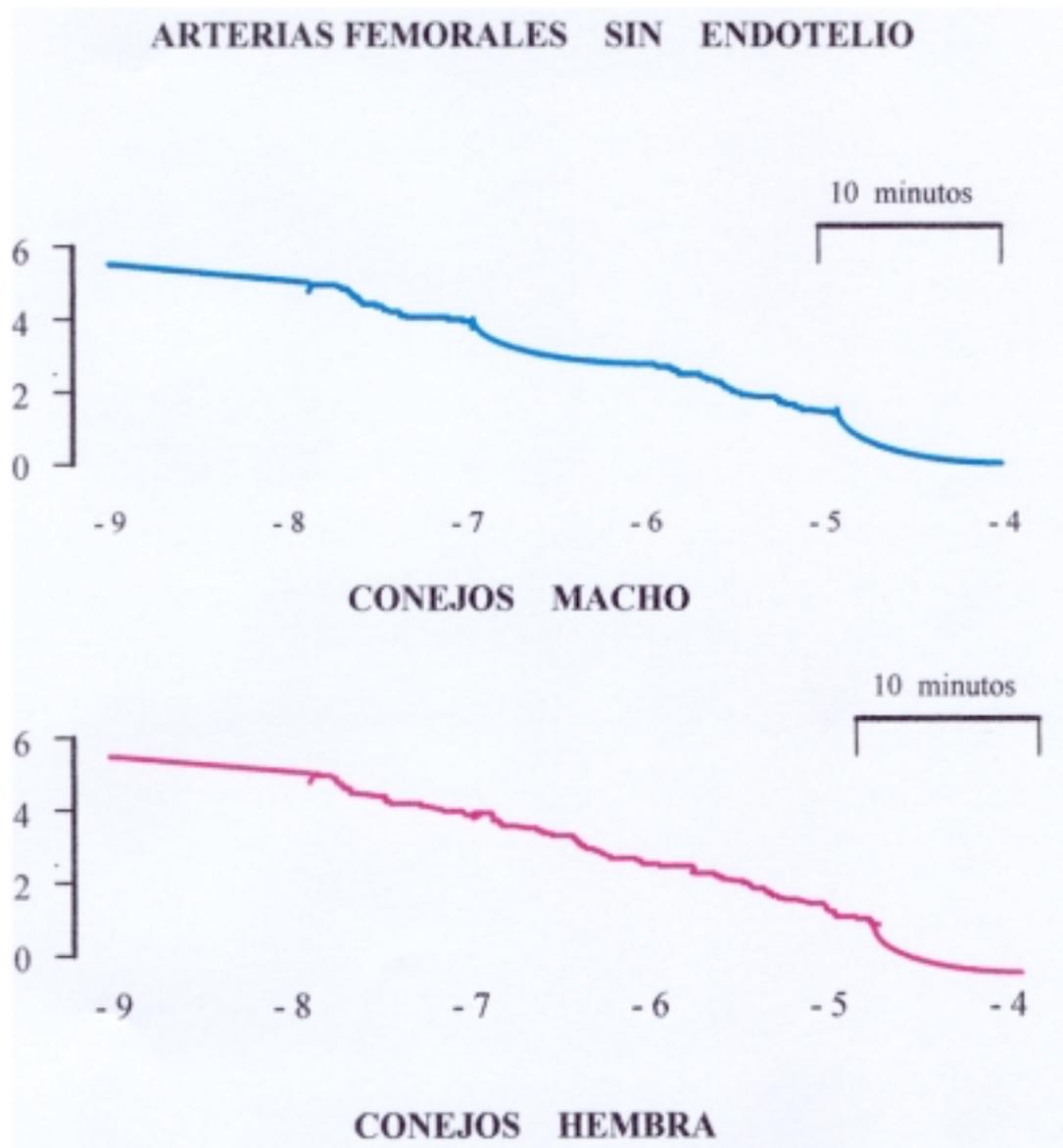


Figura 20. Efectos de la milrinona (3×10^{-8} - 10^{-4}) sobre arterias femorales sin endotelio, de conejos macho (azul), y de conejos hembra (rosa), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), entre ellos.

2. Inferencia estadística

2.1. Comparación de los efectos de la milrinona sobre las arterias pulmonares y femorales

Comparamos los efectos de la milrinona sobre el territorio vascular pulmonar, con los obtenidos en arterias femorales en iguales condiciones, así comprobamos que existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), entre la vasodilatación inducida en arterias pulmonares (pD_2 de $2,8 \pm 0,03 \times 10^{-7}$ M), y las arterias femorales (pD_2 de $9,3 \pm 0,06 \times 10^{-7}$ M), ambas con endotelio íntegro, presentando una diferencia en la pD_2 de $6,2 \pm 0,04 \times 10^{-7}$ M. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), en el efecto vasodilatador máximo, consiguiéndose en ambos territorios, la vasodilatación completa de la contracción inducida previamente. (Figura 21 y Tabla XVII)

La administración de L - NA (10^{-5} M) en las arterias pulmonares y femorales con endotelio íntegro no bloqueaba el efecto vasodilatador de la milrinona en ninguno de los dos territorios vasculares; sin embargo, comparando los efectos del L - NA sobre la vasodilatación que produce la milrinona, en las arterias pulmonares con endotelio íntegro (la pD_2 presentó un valor de $0,6 \pm 0,07 \times 10^{-7}$ M) y en las arterias femorales con endotelio intacto (pD_2 $1,1 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ M), se observa una mayor diferencia en la pD_2 que sin el L - NA ($1,04 \pm 0,05 \times 10^{-6}$ M), ya que el L - NA no sólo no

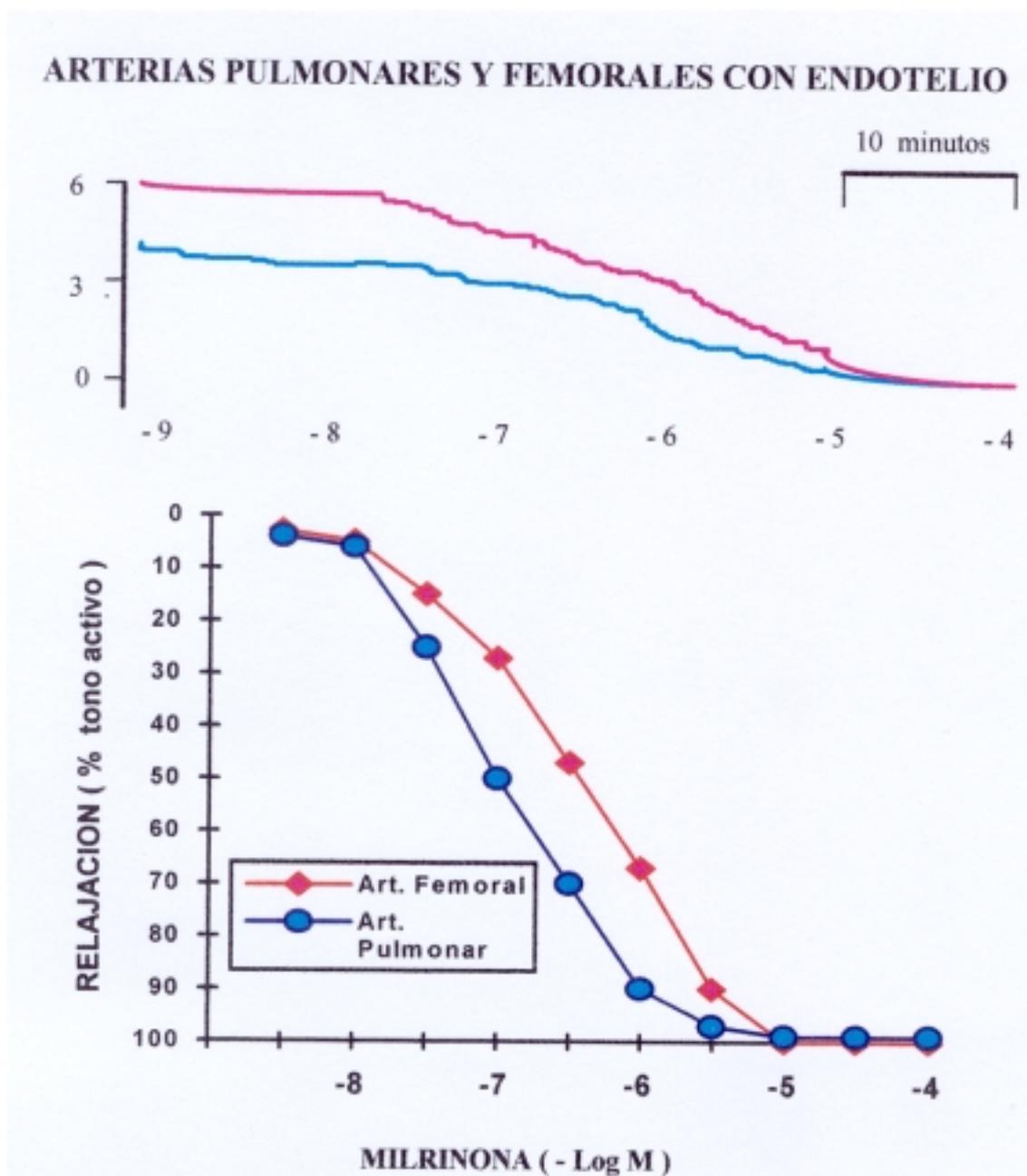


Figura 21. Comparación de los efectos de la milrinona entre arterias pulmonares (azul), y arterias femorales (rojo), ambas con endotelio íntegro.

<u>Art. PULMONAR</u>	pD₂	RELAJACION
	(M)	(% del tono activo)
CON ENDOTELIO	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-7}$	96 ± 4
CON L-NA	$9,1 \pm 0,09 \times 10^{-8}$	99 ± 1
SIN ENDOTELIO	$1,3 \pm 0,04 \times 10^{-7}$	96 ± 5
<u>Art. FEMORAL</u>		
CON ENDOTELIO	$9,3 \pm 0,03 \times 10^{-7}$	95 ± 4
CON L-NA	$2,1 \pm 0,04 \times 10^{-6}$	94 ± 5
SIN ENDOTELIO	$1,1 \pm 0,06 \times 10^{-6}$	94 ± 4

Tabla XVII. Valores de la pD₂ (M) y la relajación máxima obtenidos de las curvas dosis-efecto de la milrinona, en arterias pulmonares y femorales, con endotelio íntegro, sin endotelio, y arterias íntegras en presencia de L-NA (10⁻⁵ M).

contrarresta la vasodilatación de la milrinona en las arterias pulmonares, sino que la favorece, mientras que no modifica la vasodilatación de la milrinona en el territorio femoral (Figura 22 y Tabla XVII).

Si comparamos las curvas dosis respuesta de la milrinona en las arterias pulmonares sin endotelio con las arterias femorales también sin endotelio, vemos que existen pequeñas diferencias estadísticamente significativas, entre ambas, con una pD_2 de $1,3 \pm 0,04 \times 10^{-7}$ M en las arterias pulmonares, frente a una pD_2 de $1,1 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ M en las arterias femorales, con una diferencia significativa ($p < 0,01$) de $9,7 \pm 0,03 \times 10^{-7}$ M. Por el contrario, no existen diferencias en el efecto vasodilatador máximo, ya que en ambos territorios arteriales pulmonar y femoral la milrinona consigue un efecto vasodilatador máximo y completo de la contracción inducida con fenilefrina (Figura 23 y Tabla XVII).

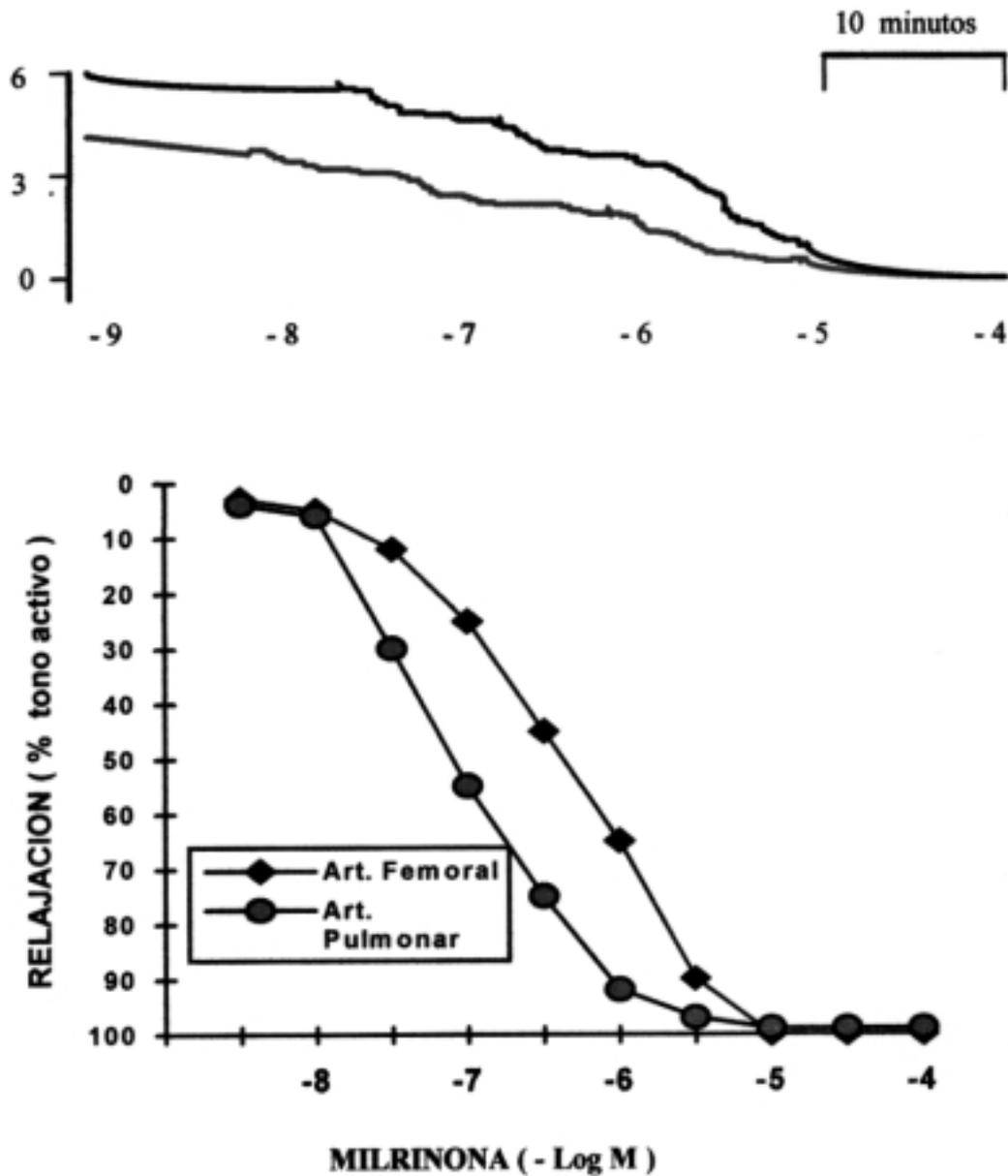
ARTERIAS PULMONARES Y FEMORALES PRETRATADAS CON L - NA

Figura 22. Comparación de los efectos de la milrinona entre arterias pulmonares (azul) y arterias femorales (rojo), ambas con endotelio íntegro y pretratadas con L - NA (10^{-5} M).

ARTERIAS PULMONARES Y FEMORALES SIN ENDOTELIO

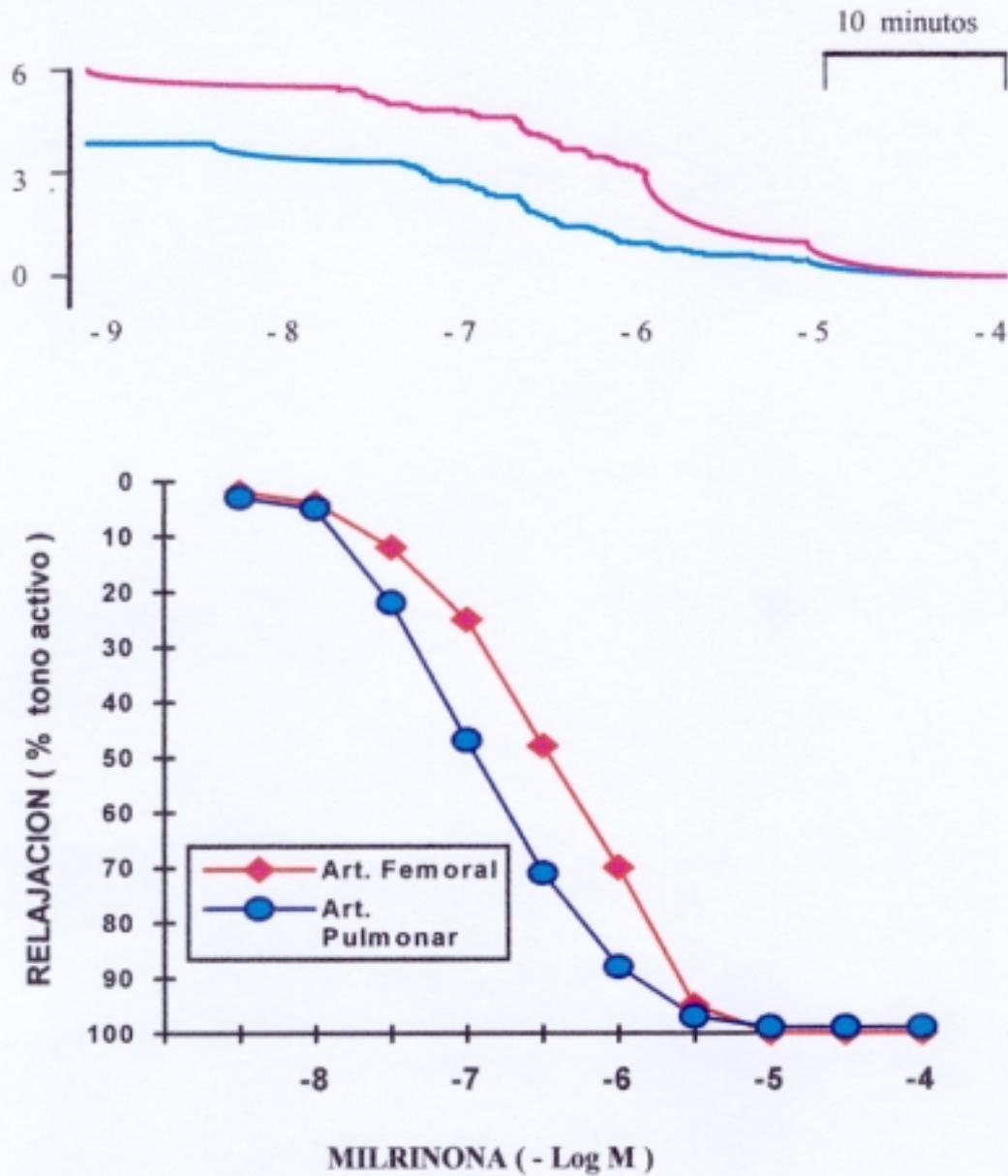


Figura 23. Comparación de los efectos de la milrinona entre arterias pulmonares (azul) y arterias femorales (rojo), ambas sin endotelio.

V. Discusión

1. DISCUSIÓN METODOLÓGICA

Para poder estudiar el comportamiento fisiológico, y farmacológico, del sistema circulatorio arterial, se han diseñado multitud de sistemas y modelos experimentales. Inicialmente se realizaron todos los esfuerzos por desarrollar estudios *in vivo*, pensando idealmente que sería mejor estudiar este sistema arterial, en la propia vasculatura intacta. (41,42)

Sin embargo, pronto se pudo observar grandes limitaciones a estos estudios *in vivo*, por dos tipos de razones: por un lado las derivadas de las propias limitaciones de las técnicas de medición, ya que los aparatos con que contamos en la clínica para el estudio de la circulación arterial están sometidos a grandes imprecisiones, y además, la mayoría de los datos de resistencias y flujos arteriales, no son medidos directamente, sino calculados a partir de las de presiones obtenidas. Todo ello hace a estos aparatos más fiables para un seguimiento evolutivo *in vivo*, que fiables a la hora de conocer exactamente un valor absoluto de un parámetro hemodinámico específico. (39,40,41)

En segundo lugar, y si cabe aún más importante, hay que recordar que en el animal en vivo se estudian efectos farmacológicos totales, siendo muy difícil, y a veces imposible, conocer a través de qué mediadores fisiológicos se ha conseguido ese efecto farmacológico. Por el contrario cuando queremos profundizar en el conocimiento de los mecanismos de actuación de un fármaco, los estudios *in vitro* nos permiten individualizar cada una de

las vías fisiológicas de acción, ya que se conocen agentes agonistas y antagonistas para cada una de ellas, de tal forma que cuando se obtiene un efecto farmacológico determinado, mediante el empleo de sustancias agonistas, y posteriormente se revierte mediante los antagonistas, podemos conocer con gran precisión los mecanismos fisiológicos por los que está actuando el fármaco. (39,40)

También los estudios *in vitro* de las acciones de fármacos sobre el sistema vascular permiten un estudio comparativo muy exacto sobre los efectos de un mismo fármaco en los distintos territorios vasculares, arteriales y venosos, encontrando mejor posibles diferencias, y pudiendo saber a qué son debidas. Sin embargo, en los estudios en vivo son difíciles de realizar estos estudios comparativos vasculares, ya que se juntan tal cantidad de interacciones fisiológicas y farmacológicas, a la vez, que pueden alterar los resultados obtenidos, y sobre todo, imposibilitar el estudio detallado de las vías y mecanismos de actuación del fármaco. (40,41)

Nosotros nos decidimos por la técnica de registro isométrico de segmentos vasculares aislados montados en alambres, por reunir dos características importantes: por un lado, la sencillez en su preparación e interpretación de los resultados, lo que evita que se produzcan sesgos debidos a la técnica de estudio, y a la vez, una igual o mayor fiabilidad que el modelo de segmentos arteriales con cilindros vasculares canulados; la única teórica ventaja que presenta este último modelo frente al de los anillos montados en alambres, es que se trata de una técnica más moderna,

desarrollada con posterioridad, y que intenta ser una aproximación más fisiológica al estado *in vivo*.

Por esta serie de razones, la técnica de registro isométrico de segmentos vasculares aislados en baño de órganos, tiene plena actualidad y vigencia para el estudio de la fisiología del sistema cardiovascular, y de los efectos de cualquier fármaco sobre este sistema. Tan es así, que nunca falta en la caracterización farmacológica de cualquier fármaco, y siempre ocupa un lugar importante en los laboratorios de experimentación de cualquier Departamento de Farmacología o Fisiología, y en la Industria Farmacéutica. (39,40,41,42)

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.1. Estudios de respuesta vascular vasoconstrictora

Dentro de los ensayos preliminares, en los que estudiamos los efectos de las sustancias vasoconstrictoras, noradrenalina y fenilefrina, sobre los segmentos arteriales pulmonares y femorales de conejo, escogimos la fenilefrina como agente, para la precontracción de estos segmentos, en los estudios posteriores de curvas dosis efecto, ya que la contracción que esta

sustancia inducía era más duradera y estable que la que conseguimos con el empleo de noradrenalina.

Cuando se realizan las curvas dosis - respuesta de la milrinona, es muy importante precontraer a los segmentos vasculares con fármacos vasoconstrictores que induzcan una contracción estable durante un tiempo superior a setenta minutos, ya que por el mecanismo de acción de la milrinona, transcurren diez minutos en estabilizarse la curva dosis - respuesta tras cada dosificación acumulativa; por tanto, si empleáramos sustancias vasoconstrictoras cuya contracción disminuyera espontáneamente en esos setenta primeros minutos, estaríamos enmascarando los resultados vasodilatadores de la milrinona.

Por esta misma razón, en estudios sobre agentes vasodilatadores, en los que se necesita el empleo de una sustancia vasoconstrictora para la realización de las curvas dosis - respuesta de inhibición, y se requiere que ésta permanezca estable durante un tiempo prolongado, muchos otros autores también emplean la fenilefrina como agente vasoconstrictor.^(192,238,239)

2.2. Estudios de respuesta vascular a marcadores endoteliales

También hay que destacar, dentro de los estudios preliminares de los efectos vasculares de los marcadores funcionales de integridad endotelial (acetilcolina y A.T.P.) en los segmentos arteriales pulmonares y femorales de conejos, la respuesta vasoconstrictora que obtuvimos con la acetilcolina, en los segmentos arteriales pulmonares. En general, el principio de acción de estos marcadores funcionales de integridad endotelial, es estimular la producción del Factor Relajante Derivado de Endotelio (E.D.R.F.), que al liberarse produce vasodilatación, sólo en aquellos segmentos vasculares que tengan el endotelio íntegro; sin embargo, no se producirá vasodilatación, en los segmento vasculares a los que se les haya quitado el endotelio, de forma intencionada o inadvertida.

La acetilcolina es el agente más clásico y tradicional de este tipo de marcadores funcionales; es más, históricamente se puede decir que el descubrimiento del Factor Relajante Derivado del Endotelio por Furchgott y Zawadzki ⁽⁵¹⁾, se debe a la acetilcolina, y a su característica de estimular los receptores muscarínicos endoteliales, activando la síntesis y liberación endotelial del E.D.R.F., y así se produce vasodilatación cuando el endotelio esté íntegro, en la mayoría de los territorios vasculares, aunque la respuesta no es uniforme. Por eso, siempre que se realiza un estudio sobre funcionalidad endotelial, se valora el efecto de la acetilcolina en el territorio vascular específicamente valorado. (39,51,53)

La respuesta vascular a la acetilcolina es variable, pudiendo producir vasodilatación o vasoconstricción, según el territorio vascular, la especie animal, incluso la dosis de acetilcolina, o las condiciones fisiopatológicas del lecho vascular en estudio. (39,53,60,241)

Son ya clásicos los estudios de Knight y col. (76) , en los que demostraron que la inyección intracoronaria, en mandriles sanos sedados, de una dosis baja de acetilcolina producía vasodilatación coronaria, sin embargo, dosis altas producían, en esos mismos animales, vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo coronario. Esta respuesta vascular a la acetilcolina, no se veía alterada por el bloqueo de los receptores α y β adrenérgicos, pero se abolía mediante la administración de atropina. Por el contrario, la arteria ilíaca de estos mandriles siempre respondía con vasodilatación a cualquier dosis de acetilcolina administrada. (60,76)

Ludmer y col. (242) estudiaron los efectos de la acetilcolina en arterias coronarias sanas y con arterioesclerosis de hombres, y comprobó que cuando existía esta enfermedad, las arterias respondían con vasoconstricción; en cambio, en arterias coronarias sanas se producía vasodilatación. Este efecto paradójico se explica porque la arterioesclerosis produce una disfunción en la síntesis endotelial de E.D.R.F.

Los efectos de la acetilcolina sobre la circulación arterial pulmonar también se han demostrado dispares, dependiendo de la especie animal y condiciones fisiopatológicas. La circulación pulmonar, como otros

territorios vasculares, recibe inervación del sistema parasimpático colinérgico, de tal forma que varios estudios han demostrado que la circulación pulmonar *in vitro* e *in vivo* responde a la administración de acetilcolina con vasodilatación; sin embargo, también se han demostrado respuestas vasoconstrictoras en segmentos arteriales aislados, como ocurre en nuestro trabajo, y en diseños experimentales de circulación pulmonar intacta, jugando un papel fundamental, según algunos autores, la estimulación que la acetilcolina puede realizar del tromboxano A₂. (241,243,244)

2.3. Respuesta vascular pulmonar y femoral a la milrinona

Desde la aparición en la literatura de los primeros trabajos experimentales sobre la milrinona en 1983, los estudios se han centrado siempre sobre su efecto inotrópico positivo; sin embargo, poco se ha estudiado, salvo en los últimos cinco años, sobre como la milrinona ejerce sus efectos vasodilatadores por relajación del músculo liso vascular, sobre sus posibles interacciones con el endotelio vascular, y sobre la posible diferente potencia vasodilatadora en las diferentes regiones del sistema cardiovascular. (13,14,15,16,17)

La milrinona produce sus efectos vasodilatadores al incrementar los niveles intracelulares de AMPc, inhibiendo su degradación, lo que facilita la

recaptación de calcio citosólico dentro del retículo sarcoplásmico, y reduce la entrada de calcio dentro de la célula, disminuyendo la disponibilidad de calcio para las miofibrillas, produciendo relajación directa de la fibra lisa vascular, sin participación, por tanto, del endotelio en este proceso, lo que justifica nuestros resultados tanto en el territorio vascular pulmonar y femoral de conejos, donde se demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las curvas dosis - respuesta de la milrinona en arterias con endotelio íntegro y sin endotelio. (33,181,239)

Por tanto, podemos decir que la vasodilatación producida por la milrinona sobre el territorio vascular pulmonar y femoral de conejos, es endotelio independiente, característica ya descrita con anterioridad en aorta de rata por Tejerina, Sesin, Delgado y Tamargo (245). Estos autores estudiaron en profundidad los efectos de la milrinona sobre la contractilidad y los flujos de calcio transmembrana en segmentos vasculares aislados de aorta de rata en baño de órganos, concluyendo en sus trabajos que la milrinona inhibe la contractilidad del músculo liso vascular, actuando directamente sobre la fibra muscular, sobre la que produce una inhibición de la entrada de calcio a la célula, y a la vez facilita la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico, lo que disminuye la disponibilidad de calcio citosólico para la contracción.

Estudios posteriores también confirman que la milrinona es un vasodilatador que no necesita factores derivados del endotelio para relajar la fibra lisa vascular, y además se ha demostrado que la milrinona no activa ni

los receptores adrenérgicos ni los histaminérgicos (238,239). En nuestros estudios, en los que inhibíamos selectivamente la producción de óxido nítrico endotelial en segmentos arteriales pulmonares y femorales de conejos con endotelio íntegro, los resultados demuestran que los efectos vasodilatadores de la milrinona no disminuyen, ni en el territorio femoral ni en el pulmonar, al bloquear la síntesis de óxido nítrico.

Por tanto, podemos sugerir, que la milrinona es un agente relajante directo de la fibra lisa vascular de arterias femorales y pulmonares de conejos sanos, sin mediar en esta vasodilatación ni el óxido nítrico, ni ningún otro factor vasodilatador derivado del endotelio. En estudios previos, también se ha demostrado que la milrinona posee efectos vasodilatadores sobre diferentes territorios vasculares de animales y hombres; así, Defeo y col. (246) publican, por primera vez, los efectos vasodilatadores de la milrinona sobre arterias coronarias humanas; Lindgren y col. (247) estudian en 1989, los efectos vasodilatadores de la milrinona sobre arterias y venas mesentéricas humanas, y estos mismos autores, en 1991 (238), realizan un estudio comparativo de los efectos vasculares de la milrinona sobre arterias coronarias, pulmonares y renales, humanas y de ratas, en el que llegan a la conclusión que la milrinona tiene efectos vasodilatadores en todos estos territorios vasculares, y que es un vasodilatador menos potente sobre arterias renales y pulmonares de rata, en comparación con estos mismos territorios de hombres. (238,246,247)

Harris y col. (248) estudiaron comparativamente *in vitro* los efectos de la milrinona sobre segmentos arteriales coronarios, renales y cerebrales de perros sanos, llegando a la conclusión que la milrinona es un vasodilatador más potente y selectivo de arterias coronarias, que de arterias renales o cerebrales, que esta acción vasodilatadora se debe a la elevación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos, y que su mecanismo de acción difiere de los efectos vasodilatadores de los calcio antagonistas, nimodipino y nifedipino.

Recientemente Salmenperä y Levy (239) han estudiado *in vitro* los efectos vasculares de la milrinona, la enoximona, la amrinona y la papaverina, sobre segmentos aislados de arteria mamaria interna humana, llegando a la conclusión que la milrinona es la que presenta una curva dosis - respuesta con la ED₅₀ menor, y por tanto es la más potente vasodilatadora, y la que más utilidad presentaría en la prevención del vasoespasmo de la arteria mamaria interna, tras la cirugía de revascularización coronaria con esta arteria.

Nuestros estudios comparativos de la potencia vasodilatadora de la milrinona sobre el territorio vascular pulmonar y femoral muestran una curvas dosis - respuesta muy parecidas, pero con una ED₅₀ siempre menor en las arterias pulmonares, tanto con como sin endotelio, lo que indica que la milrinona es más potente sobre las arterias pulmonares que sobre las femorales de conejos Gigante Español, aunque esta diferencia vasodilatadora sea pequeña.

Los primeros estudios dirigidos de forma clara sobre los efectos de la milrinona en la circulación pulmonar fueron realizados por Harbison y col. (249) en anillos arteriales pulmonares aislados de vacas y lecho vascular pulmonar de gatos, comparando los efectos de la milrinona con los obtenidos con amrinona, concluyendo que la milrinona tiene efectos más potentes sobre la circulación pulmonar.

Rossing y Dorazen (250) investigaron los efectos del isoproterenol, la aminofilina, y la milrinona, sobre el músculo liso traqueal, el parénquima pulmonar, y sobre las arterias pulmonares de cerdos, concluyendo que la milrinona era el único fármaco que tenía un efecto vasodilatador más potente sobre las arterias pulmonares que sobre el músculo traqueal o el parénquima pulmonar, añadiendo como hallazgo muy novedoso, en cuanto al mecanismo de acción de la milrinona, el que la indometacina era capaz de inhibir la vasodilatación que la milrinona producía sobre la fibra lisa traqueal; sin embargo, no alteraba su efecto sobre los vasos arteriales pulmonares y sobre el parénquima pulmonar, sugiriendo que la milrinona puede tener distintos mecanismos de acción según los diferentes tejidos, y que, al menos en la fibra lisa traqueal, deben jugar un papel importante las prostaglandinas, en la relajación que la milrinona produce en este tejido.

Tajimi , Tanaka y col. (251) han abierto una línea de investigación, centrada en los efectos vasodilatadores de diferentes inhibidores de fosfodiesterasas, sobre la circulación pulmonar, así en 1989, demostraron que el ZSY - 27, un nuevo derivado biperidínico, inhibidor de

fosfodiesterasas del tipo III, con potentes efectos vasodilatadores e inotrópicos, presentaba una vasodilatación pulmonar selectiva en perros con hipertensión pulmonar.

Estos resultados les hicieron estudiar los efectos de la milrinona sobre la circulación pulmonar de perros con hipertensión pulmonar, provocada mediante la inyección masiva de fragmentos de músculo del propio animal, en comparación con perros sanos. En estas primeras investigaciones llegaron a la conclusión que la milrinona podía poseer un efecto vasodilatador pulmonar selectivo en perros con hipertensión pulmonar; sin embargo, no pudieron explicar el mecanismo por el cual se produce esta selectividad de acción, postulando que uno de los factores principales sería la inhibición de la agregación plaquetaria producida por la milrinona al incrementar el AMPc dentro de las plaquetas, y esto disminuiría la presión arterial media pulmonar. Estos autores concluyen que se necesitarían más estudios de los efectos de la milrinona sobre la circulación pulmonar para conocer mejor estos efectos. (252,253)

Estudios posteriores de Tanaka y col. (254) evalúan los efectos de la milrinona sobre el contenido pulmonar de agua, en perros con hipertensión pulmonar inducida mediante la inyección de bolitas de cristal disueltas en suero salino, en estos perros, la milrinona volvió a demostrar efectos vasodilatadores pulmonares selectivos. Para estudiar el mecanismo de acción midieron en estos animales el contenido pulmonar de agua, mediante el cálculo del volumen pulmonar de agua extravascular por técnica de

termodilución (E.T.V. _L), además la mitad de los animales se sacrificaron, y también se midió gravimétricamente el volumen de contenido pulmonar de agua.

Los autores concluyeron que la milrinona produce vasodilatación pulmonar en perros con hipertensión pulmonar, dando lugar a una reducción en el gradiente de presión transmural de los capilares pulmonares, como expresa la hipótesis de Starling. De esta forma Tanaka y col. (254) sugieren que la reducción del gradiente de presiones transmural capilar que produce la milrinona, puede también prevenir el aumento del volumen de agua pulmonar extravascular, por lo que la milrinona tendría un efecto preventivo en la formación de edema pulmonar. Los autores justifican este efecto farmacológico de la milrinona por el incremento de los niveles de AMPc dentro de la fibra lisa muscular y también dentro de las plaquetas y del endotelio vascular, lo que hace que se establezca de forma directa o indirecta la permeabilidad endotelial capilar pulmonar.

La mayoría de los estudios clínicos en hombres se han dedicado a los efectos de la milrinona en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, prestando poca atención al soporte hemodinámico en insuficiencias cardíacas agudas o reagudizaciones de insuficiencias cardíacas crónicas. En los últimos cuatro años se están dirigiendo los estudios hacia las situaciones de fallo miocárdico agudo, y recientemente, se centran en la evaluación de los posibles efectos beneficiosos en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda e hipertensión pulmonar, situación frecuente en

el periodo perioperatorio de la cirugía cardiovascular y torácica. (22,23,24,26,31, 32,210,255,256)

Hay varios factores que han influido en el aumento de la incidencia de episodios de hipertensión pulmonar en el periodo postoperatorio de las cirugías mencionadas; por un lado se ha incrementado importantemente la edad media de los pacientes que se operan, debido al aumento de la esperanza media de vida en la población, y también a que hoy día se aceptan para cirugía pacientes en condiciones clínicas muy límite, que antes se rechazaban por la escasa supervivencia postoperatoria, habiendo aumentado el número de pacientes que ya han sido operados varias veces, incluso de cirugías de alta mortalidad y morbilidad. (255)

Dentro de los primeros estudios clínicos que sugieren que la milrinona produce una reducción significativa en las resistencias vasculares pulmonares, se encuentran los realizados por Scott Monrad y col. (256), que valoraron los efectos de la milrinona sobre la circulación coronaria y el consumo energético miocárdico en 18 pacientes con insuficiencia cardíaca grado III y IV de la *New York Heart Association* (N.Y.H.A.); sin embargo, sus resultados se centran en el efecto inotrópico positivo potente de la milrinona, sin que se produzca un incremento significativo del consumo miocárdico de oxígeno.

Benotti y col. (18) realizaron uno de los primeros estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de la milrinona, en pacientes con

insuficiencia cardíaca severa grado III y IV de la N.Y.H.A., en el que ya reconoce que la milrinona produce una disminución dosis dependiente de la presión arterial pulmonar; sin embargo, propone un modelo de distribución de la milrinona bicompartimental, que hoy día se encuentra en entredicho, gracias a investigaciones recientes, que muestran que un modelo tricompartmental se ajusta mejor a la biodistribución de este fármaco.^(18,32,33,34,35,210)

Eichorn y col. ⁽²⁵⁷⁾ inicialmente, y Mager y col. ⁽²⁵⁸⁾ más recientemente, estudiaron los efectos de la milrinona sobre la función del ventrículo derecho en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva severa, grado funcional IV de la N.Y.H.A., y compararon los efectos de la milrinona con los obtenidos con dobutamina. Llegaron a la conclusión que el incremento en la fracción de eyección del ventrículo derecho era comparable con ambos tratamientos; sin embargo, sólo en el tratamiento con la milrinona se acompañaba, simultáneamente, el incremento en la función inotrópica positiva con una clara reducción en la postcarga del ventrículo derecho, en contraposición con el tratamiento con dobutamina, en el que la mejora de la función ventricular derecha se debía fundamentalmente a un incremento del inotropismo positivo, con escasa repercusión sobre la postcarga del ventrículo derecho.

En los últimos años están apareciendo estudios encaminados a valorar la efectividad de la milrinona en la recuperación tras circulación extracorpórea y en el postoperatorio inmediato de cirugía cardíaca. Dentro

de estas investigaciones son de referencia obligada los trabajos de Feneck y el Grupo de Estudio Multicéntrico Europeo sobre la milrinona (23,24), en los que noventa y nueve pacientes que fueron operados electivamente, para revascularización coronaria, sustitución de válvula mitral o sustitución de válvula aórtica, fueron tratados con la milrinona. (26,31,32,33,37,177,210,255)

Estos estudios demostraron que la milrinona producía un efecto beneficioso en el gasto cardíaco, pero además del efecto sobre la contractilidad miocárdica, se demostró que se producía una reducción significativa en la presión pulmonar media, y en las resistencias vasculares pulmonares de estos pacientes, tras una dosis de carga de 50 µgr. / Kg. durante 10 minutos de milrinona. Los resultados sobre los efectos en la circulación pulmonar fueron muy variables, no teniendo una relación clara con la dosis administrada; sin embargo, los propios autores reconocen que esto puede ser debido a que se trataba de un grupo de pacientes muy heterogéneo, no existiendo un grupo específico de pacientes con hipertensión pulmonar. (23,24,26,255)

Por ello, estos mismos autores subdividieron los pacientes en dos grupos, según la cifra de resistencias vasculares pulmonares que presentaron antes de ser tratados con la milrinona; pacientes con y sin hipertensión pulmonar. Este estudio comparativo mostró que se producía una reducción significativa en la presión arterial pulmonar media y en las resistencias vasculares pulmonares, al igual que un incremento en el índice cardíaco, en ambos grupos de pacientes tratados; sin embargo, existían diferencias

significativas entre estos dos grupos, ya que los pacientes con hipertensión pulmonar previa al tratamiento presentaban un mayor incremento en el índice cardíaco, a la vez que una mayor disminución en las resistencias vasculares pulmonares y en la presión pulmonar media. (23,24,26,255)

En los dos últimos años se han realizado nuevos trabajos sobre el empleo de la milrinona tras cirugía cardíaca, estudiando detalladamente la farmacocinética y la farmacodinamia de este producto tras la circulación extracorpórea. Por un lado Das y col. (31) evaluaron siete pacientes tras cirugía electiva cardíaca con circulación extracorpórea, Bailey y col. (32) estudiaron veinticinco pacientes en estas mismas circunstancias, con tres distintas pautas terapéuticas, y Butterworth JF y col. (33) , analizaron el empleo de la milrinona a diferentes dosis, en veintinueve pacientes, tras cirugía cardíaca electiva con utilización de circulación extracorpórea. Un dato novedoso que aportaron estos tres estudios fue que el modelo de distribución que mejor se ajusta a la milrinona es el tricompartmental, mejor que el bicompartimental descrito en los estudios farmacocinéticos previos.(37,177,210)

Aparte de este nuevo dato, que una vez más pone de manifiesto que la milrinona salió al mercado sin el suficiente número de estudios experimentales preliminares, de una forma precipitada, también se demuestra que la milrinona produce reducción significativa de las resistencias vasculares pulmonares y de la presión pulmonar media en el

postoperatorio de cirugía cardíaca electiva con circulación extracorpórea.^(31,32,33,37,177,210)

Chang y col. ⁽³⁷⁾ han evaluado los efectos hemodinámicos del tratamiento con la milrinona en diez neonatos que presentaban bajo gasto cardíaco postcirculación extracorpórea, tras cirugía cardíaca electiva. Llegaron a la conclusión que la milrinona reduce las presiones de llenado de ambos ventrículos, la presión arterial media sistémica y pulmonar, y las resistencias vasculares arteriales sistémicas y pulmonares, incrementando al mismo tiempo el índice cardíaco, sin aumentar el consumo miocárdico de oxígeno; sin embargo, se muestran cautelosos en relación a las posibles propiedades vasodilatadoras selectivas sobre la circulación pulmonar, sugiriendo que se necesitarán más estudios, con un mayor número de pacientes, para esclarecer las propiedades vasodilatadoras pulmonares de la milrinona.

Dentro de los estudios españoles sobre los efectos de la milrinona en pacientes programados para cirugía cardíaca con circulación extracorpórea, destaca el trabajo de M.C. Batet y M. Pacheco ⁽²⁵⁹⁾, que compararon los efectos de la milrinona versus dopamina y nitroglicerina, en el manejo postoperatorio de 81 pacientes sometidos a cirugía cardíaca electiva, tanto de revascularización coronaria, como de sustitución valvular mitral o aórtica.

En el estudio comparativo de estas dos pautas de tratamiento sobre el efecto vasodilatador en la circulación pulmonar, estos autores afirman que en pacientes valvulares con hipertensión pulmonar preoperatoria, la milrinona conseguía una disminución mayor de las resistencias vasculares pulmonares (R.V.P.) y de la presión pulmonar arterial media (P.A.P.M.) que la dopamina combinada con la nitroglicerina; sin embargo, esta diferencia en los efectos vasodilatadores entre los dos tratamientos, no se mantenía en los enfermos con enfermedad coronaria y sin hipertensión pulmonar, en los que la milrinona produce una disminución inicial de las R.V.P. y de la P.A.M.P., que no se mantiene en las veinticuatro horas siguientes. (259)

Batet y Pacheco (259) concluyen en este trabajo que el tratamiento con la milrinona, en pacientes con patología valvular y coronaria intervenidos de cirugía cardíaca bajo circulación extracorpórea, tiene unas consecuencias hemodinámicas, inotrópicas positivas y vasodilatadoras, claras, que permite considerarlo como una mejor opción terapéutica que el tratamiento con dopamina más nitroglicerina. La milrinona produce un aumento significativo del gasto cardíaco, del índice cardíaco, de los índices de trabajo ventriculares, y del índice de volumen sistólico, al igual que un descenso de las resistencias vasculares pulmonares y sistémicas, sobre todo en enfermos valvulares.

Clarke y col. (260) realizaron estudios de los efectos de la milrinona, el dipyridamol y el zaprinast sobre la circulación pulmonar de conejos. En

estos trabajos se incrementaron, inicialmente, las resistencias vasculares pulmonares (R.V.P.), mediante la administración de un agonista del tromboxano A₂, el U46619, realizándose a continuación curvas dosis - respuesta de inhibición de las R.V.P., mediante los tres fármacos, individual y conjuntamente.

Estos autores llegaron a la conclusión que tanto la milrinona (un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa del grupo III), como el dipiridamol y el zaprinast (inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa del grupo V), son capaces de disminuir las R.V.P. de forma dosis dependiente, y además, la combinación de un inhibidor de la P.D.E. del grupo V con la milrinona actúa de forma sinérgica en la reducción de las R.V.P. (260)

Sin embargo, los inhibidores de la fosfodiesterasa del grupo V presentaron una ED₅₀ menor que la milrinona, por lo que estos autores opinan que tanto la fosfodiesterasa del grupo III, como la del grupo V, juegan un papel importante en el control de las R.V.P., aunque la fosfodiesterasa del grupo V debe realizar una función más destacada. A la vista de estos resultados, proponen más investigaciones para dilucidar si el uso combinado de la milrinona y el dipiridamol, pudiera jugar un papel importante en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. (260)

El tratamiento efectivo de la hipertensión pulmonar reversible dependerá de muchos factores; en primer lugar, de los cambios fisiopatológicos que se hayan producido en el corazón, fundamentalmente

sobre la función del ventrículo derecho, y los cambios sobre los vasos arteriales pulmonares, así como de la selectividad farmacológica sobre la circulación pulmonar. Lógicamente el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar tendrá sentido siempre que aún no se haya llegado a la fase terminal, en la que la hipertensión pulmonar está irreversiblemente establecida y ha causado un fracaso ventricular derecho intratable.

En el manejo de la hipertensión pulmonar siempre se ha intentado buscar fármacos vasodilatadores selectivos que sólo produjeran vasodilatación pulmonar; sin embargo, todos los fármacos que se han utilizado (nitroprusiato sódico, tolazolina, prostaglandinas, isoproterenol, etc...), han presentado el inconveniente de producir vasodilatación sistémica conjuntamente, por lo que en muchas ocasiones, no sólo no mejoran la clínica del paciente, sino que la empeoran. En este sentido, el gran avance terapéutico, sin ninguna duda, lo ha supuesto el óxido nítrico inhalado, único agente vasodilatador pulmonar selectivo que carece de efectos vasodilatadores sistémicos. (261)

A pesar de la aparición de este vasodilatador selectivo, sigue existiendo un vacío terapéutico en el manejo de la hipertensión pulmonar, cuando ésta se asocia a disfunción ventricular y bajo gasto cardíaco, situación frecuente, tras cirugía cardíaca con circulación extracorpórea, donde es necesario disponer de agentes con cierta selectividad vasodilatadora pulmonar, y además, de un potente efecto inotrópico positivo. En estas situaciones la milrinona, al igual que otros inhibidores de

P.D.E. del grupo III en estudio, ocuparán un papel terapéutico importante.^(37,255)

Como ya hemos expuesto, existen varios estudios, experimentales y clínicos, que sugieren que la milrinona tiene un papel beneficioso en el tratamiento de la hipertensión pulmonar reversible, sobre todo cuando esta se ve asociada a una situación de bajo gasto cardíaco, aunque hay que guardar siempre una gran cautela al trasladar a la clínica los datos obtenidos, en los estudios experimentales, al igual que en la interpretación de datos obtenidos en series clínicas, donde el número de pacientes es escaso, y además, se juntan tantas situaciones fisiopatológicas en un mismo paciente, que enmascaran los resultados y hacen verdaderamente difícil su homogeneización.

Por otra parte, no todos los trabajos sobre la milrinona son tan positivos; es más, su primer estudio clínico prospectivo randomizado de supervivencia, el estudio PROMISE⁽²¹⁶⁾, en el que se realizó un tratamiento oral con dosis altas de la milrinona (40 mg. diarios durante varios meses), en pacientes con insuficiencia cardíaca severa grado funcional III y IV de la N.Y.H.A., demostró que el grupo de pacientes tratados con la milrinona presentaba un 28 % más de tasa de mortalidad que el grupo tratado con placebo, por lo que hubo que interrumpir el ensayo antes de su finalización. Se achacó este aumento de mortalidad que produjo la milrinona, a una capacidad arritmogénica del fármaco, que en estudios electrofisiológicos

posteriores no se ha podido demostrar, o por algún daño sobre la célula miocárdica no bien conocido. (21)

También algunos autores, como Remme y col. (262,263) , no son partidarios del tratamiento crónico con la milrinona para los estados de insuficiencia cardíaca, ya que según sus estudios la milrinona produce efectos contrapuestos sobre la función de bomba del corazón; así pues, en los pacientes con moderada o leve insuficiencia cardíaca, que presentan presiones capilares pulmonares menores de 15 mm Hg., no sólo no se incrementaba el gasto cardíaco con la administración de una sola dosis oral de la milrinona, sino que incluso disminuía, por que Remme desaconseja el tratamiento crónico con la milrinona para la insuficiencia cardíaca.

Sin embargo, estudios más recientes, realizados por Seino y col. (34) , con un número considerablemente mayor de pacientes, han evaluado los efectos hemodinámicos y la farmacocinética del tratamiento oral con la milrinona, en situaciones de insuficiencia cardíaca aguda o crónica reagudizada, obteniendo en todos ellos un incremento en el índice cardíaco, a la vez que una disminución en la presión capilar pulmonar, acompañado todo ello con una mejora clara de los síntomas subjetivos y de la exploración clínica del paciente, por tanto este grupo de autores vuelve a valorar positivamente el tratamiento oral con la milrinona a dosis bajas (10 mg/día), durante cortos periodos de tiempo, para el soporte inotrópico, en pacientes con fallo cardíaco agudo o crónico descompensado.

VI. Conclusiones

Una vez analizados y discutidos nuestros resultados, las principales conclusiones a las que hemos llegado, se exponen a continuación:

1. La milrinona produce vasodilatación dosis dependiente en anillos arteriales pulmonares y femorales de conejos Gigante Español, consiguiendo en ambos territorios una relajación completa de la contracción inducida previamente con fenilefrina. No encontramos diferencias en los efectos vasculares de la milrinona en relación con el sexo de los animales.
2. La desendotelización de los segmentos arteriales pulmonares y femorales, no disminuye los efectos vasodilatadores de la milrinona, por lo que podemos decir que la vasodilatación inducida por ésta es endotelio-independiente.
3. La inhibición selectiva de la síntesis de óxido nítrico, mediante el empleo de un análogo de la L - arginina (L - NA), en segmentos arteriales pulmonares de conejos con endotelio íntegro, potencia la acción vasodilatadora de la milrinona.
4. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico en anillos arteriales femorales con endotelio íntegro, no modificó la respuesta vascular a la milrinona. Por ello podemos decir que en el territorio arterial femoral de conejos, el efecto vasodilatador de la milrinona no se ve

potenciado por la inhibición de la síntesis de NO, a diferencia de lo que ocurre en el territorio arterial pulmonar.

5. En los estudios comparativos de los efectos vasculares de la milrinona en los segmentos arteriales pulmonares y femorales, ésta se presenta como un fármaco vasodilatador potente en ambos territorios, no existiendo diferencias significativas en el efecto máximo vasodilatador.

6. Sin embargo, si comparamos las concentraciones molares de la milrinona para obtener el cincuenta por ciento del efecto máximo vasodilatador, en las arterias pulmonares y en las femorales, vemos que existen diferencias significativas, que nos demuestran que las arterias pulmonares son más sensibles a la milrinona que las arterias femorales.

VII. Bibliografía

1. Poole-Wilson PA. Chronic heart failure: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and investigations. En: Julian DG, Camm AJ, Fox KM, Hall RJ, Poole-Wilson PA, editores. Diseases of the heart. Londres: WB Saunders Co, 1996; 467-481.
2. Hug CC Jr, Shanewise JS. Anesthesia for adult cardiac surgery. En: Miller RD, editor. Anesthesia. Nueva York: Churchill Livingstone Inc, 1994; 1757-1810.
3. Cortina A, Moris C, Lambert JLR, Cortina R. Insuficiencia cardiaca congestiva: Bases fisiopatológicas e implicaciones terapéuticas. Barcelona: JR Prous, 1992.
4. Cohn JN. Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. Clin Cardiol 1995; 18: IV-4-IV-12.
5. Eriksson H. Heart failure: a growing public health problem. J Intern Med 1995; 237: 135-141.
6. Stoelting RK, Dierdorf SF. Congestive heart Failure. En: Stoelting RK, Dierdorf SF, editores. Anesthesia and co-existing disease. Nueva York: Churchill Livingstone Inc, 1993; 87-96.
7. Roizen MF, Ellis JE. Anesthesia for vascular surgery. En: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, editores. Clinical anesthesia. Filadelfia: JB Lippincott Company, 1992; 1059-1094.
8. Sladen MB. Low output states in the postoperative period. En: Kaplan JA, editor. Vascular anesthesia. Nueva York: Churchill Livingstone Inc, 1991; 626-629.
9. Benotti JR, Grossman W, Braunwald E, Carabello BA. Effects of amrinone on myocardial energy metabolism and hemodynamics in patients with severe congestive heart failure due to coronary artery disease. Circulation 1980; 62: 28-34.

-
10. Colucci WS, Wright RF, Braunwald E. New positive inotropic agents in the treatment of congestive heart failure: mechanisms of action and recent clinical developments. *N Engl J Med* 1986; 314: 349-358.
 11. Stauffer JC, Gaash WH. Recognition and treatment of left ventricular diastolic dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1990; 32: 319-332.
 12. Grossman W. Diastolic function and heart failure: an overview. *Eur Heart J* 1990; 11: 2-C-7-C.
 13. Alousi AA, Canter JM, Montenaro MJ, Fort DJ, Ferrari RA. Cardiotonic activity of milrinone, a new and potent cardiac bipyridine, on the normal and failing heart of experimental animals. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5: 792-803.
 14. Alousi AA, Stankus GP, Stuart JC, Walton LH. Characterization of the cardiotonic effects of milrinone, a new and potent cardiac bipyridine, on isolated tissues from several animal species. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5: 804-811.
 15. Pastelin G, Mendez R, Kabela E, Farah A. The search for a digitalis substitute II milrinone (Win 47203). Its action on the heart-lung preparation of the dog. *Life Sci* 1983; 33: 1787-1796.
 16. Edelson J, Koss RF, Baker JF, Park GB. High-performance liquid chromatographic analysis of milrinone in plasma and urine. Intravenous pharmacokinetics in the dog. *J Chromatogr* 1983; 276: 456-462.
 17. Baim DS, McDowell AV, Cherniles J, Monrad ES, Parker JA, Edelson J, Braunwald E, Grossman W. Evaluation of a new bipyridine inotropic agent milrinone in patients with severe congestive heart failure. *N Engl J Med* 1983; 309: 748-756.
 18. Benotti JR, Lesko LJ, McCue JE, Alpert JS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of milrinone in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1985; 56: 685-689.

19. Monrad ES, Baim DS, Smith HS, Lanoue A, Brauwald E, Grossman W. Effects of milrinone on coronary hemodynamics and myocardial energetics in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1985; 71: 972-979.
20. Fitzpatrick PG, Cinquegrani MP, Vakiener AR, Baggs JG, Biddle TL, Liang CS, Hood WB Jr. Hemodynamic and regional blood flow response to milrinone in patients with severe congestive heart failure: a dose-ranging study. *Am Heart J* 1987; 114: 97-105.
21. Anderson JL, Baim DS, Fein SA, Goldstein RA, LeJemtel TH, Likoff MJ. Efficacy and safety of sustained (48 hour) intravenous infusions of milrinone in patients with severe congestive heart failure: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1987; 9: 711-722
22. Braunwald E. Intravenous milrinone: Therapeutic responses in heart failure. *Am Heart J* 1991; 121: 1937-1938.
23. Feneck RO. Intravenous milrinone following cardiac surgery: I. Effects of bolus infusion followed by variable dose maintenance infusion. The European Milrinone Multicentre Trial Group. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1992; 6: 554-562.
24. Feneck RO. Intravenous milrinone following cardiac surgery: II. Influence of baseline hemodynamics and patient factors on therapeutic response. The European Milrinone Multicentre Trial Group. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1992; 6: 563-567.
25. George M, Lehot JJ, Estanove S. Haemodynamic and biological effects of intravenous milrinone in patients with a low cardiac output syndrome following cardiac surgery: multicentre study. *Eur J Anaesthesiol* 1992; 5: 31-34.
26. Copp MV, Hill AJ, Feneck RO. Overview of the effects of intravenous milrinone in acute heart failure following surgery. *Eur J Anaesthesiol* 1992; 5: 35-41.

-
27. Arnold JM. The role of phosphodiesterase inhibitors in heart failure. *Pharmacol Ther* 1993; 57: 161-170.
 28. Nanimatsu H, Saikawa T, Maeda T, Fukuoka Y, Takaki R. Hemodynamic effects of milrinone in patients with congestive heart failure short and long term follow up studies. *Jpn Circ J* 1993; 57: 91-101.
 29. Brecker SJ, Xiao HB, Mbaissouroum M, Gibson DG. Effects of intravenous milrinone on left ventricular function in ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1993; 71: 203-209.
 30. Om A, Hess ML. Inotropic therapy of the failing myocardium. *Clin Cardiol* 1993; 16: 5-14.
 31. Das PA, Skoyles JR, Sherry KM, Peacock JE, Fox PA, Woolfrey SG. Disposition of milrinone in patients after cardiac surgery. *Br J Anaesth* 1994; 72: 426-429.
 32. Bailey JM, Levy JH, Kikura M, Szlam F, Hug CC Jr. Pharmacokinetics of intravenous milrinone in patients undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology* 1994; 81: 616-622.
 33. Butterworth JF 4th, Hines RL, Royster RL, James RL. A pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of milrinone in adults undergoing cardiac surgery. *Anesth Analg* 1995; 81: 783-792.
 34. Seino Y, Takano T, Hayakawa H, Kanmatsuse K, Saitoh S, Saitoh T, et al. Hemodynamic effects and pharmacokinetics of oral milrinone for short term support in acute heart failure. *Cardiology* 1995; 86: 34-40.
 35. Woolfrey SG, Hegbrant J, Thysell H, Fox PA, Lendrem DW, Lockwood GF, et al. Dose regimen adjustment for milrinone in congestive heart failure patients with moderate and severe renal failure. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47: 651-655.

-
36. Shubert J, Mancano MA, Pina IL, Milfred SK. Criteria for use of intravenous milrinone in adult inpatients. *Am J Health Syst Pharm* 1995; 52: 1918-1919.
 37. Chang AC, Atz AM, Wernovsky G, Burke RP, Wessel DL. Milrinone: systemic and pulmonary hemodynamic effects in neonates after cardiac surgery. *Crit Care Med* 1995; 23: 1907-1914.
 38. Alonso C, Calvo I, Diarte JA, Gomollon JP, Placer LJ. Opciones terapeuticas en el shock cardiogenico. *Rev Esp Cardiol* 1995; 48: 573-580.
 39. Furchgott RF. Endothelium - dependent relaxation in systemic arteries. En: Vanhoutte PM, editor. *Relaxing and contracting factors*. Clifton: The Humana Press Inc, 1988; 1-21.
 40. Bevan JA, Bevan RD. Changes in arteries as they get smaller. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium*. Nueva York: Raven Press Ltd, 1988; 55-60.
 41. Klír P, Pravenec M. Models in experimental medicine. En: Deyl Z, Zicha J, editores. *Methods in animal physiology*. Florida: CRC Press Inc, 1989; 3-10.
 42. Halpern W. Common *in vitro* investigative methods. En: Bevan JA, editor. *The resistance vasculature*. Clifton: The Humana Press Inc, 1991; 45-57.
 43. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
 44. The bibliographic database of the National Library of Medicine. MEDLINE on Silverplatter. 1908-1995.
 45. Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 241-250.

46. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87: V-51-V-55.
47. Davies MG, Hagen PC. The vascular endothelium: a new horizon. *An Surg* 1993; 218: 593-609.
48. Riezbos j, watts IS, Vallance PJT. Endothelin receptors mediating functional responses in human small arteries and veins. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 609-615.
49. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 679-705.
50. Daugherty MO, Rich GF, Johns RA. Vascular endothelium. *Curr Opin Anaesthesiol* 1995; 8: 88-94.
51. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
52. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984; 308: 645-647.
53. Furchgott RF. The discovery of endothelium-dependent relaxation. *Circulation* 1993; 87: V-3-V-8.
54. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 1995; 27: 331-340.
55. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic GMP formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219: 181-186.

-
56. Vane JR, Angard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
 57. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
 58. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. *Proc Natl Acad sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
 59. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. 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; 244: 181-189.
 60. Searle NR, Sahab P. Endothelial vasomotor regulation in health and disease. *Can J Anaesth* 1992; 39: 838-857.
 61. Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87: V-9-V-17.
 62. Matsuda T, Bates JN, Lewis ST, Abboud FM, Chapleau MW. Modulation of baroreceptor activity by nitric oxide and S-nitrosocysteine. *Circ Res* 1995; 76: 426-433.
 63. Billiar TR. Nitric oxide: Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995; 221: 339-349.
 64. Sembowicz A, Hecker M, MacArthur H, Sessa WC, Vane JR. Nitric oxide and another potent vasodilator are formed from N^G-hydroxy-L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 11172-11176.
 65. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.

-
66. Shen W, Zhang X, Zhao G, Wolin MS, Sessa W, Hintze TH. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1125-1134.
 67. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 87-104.
 68. Harrison DG, Venema RC, Arnal JF, Inoue N, Ohara Y, Sayegh H, et al. The endothelial cell nitric oxide synthase: is it really constitutively expressed?. *Agents Actions Suppl* 1995; 45: 107-117.
 69. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
 70. Liu JJ, Chen JR, Wiley J, Johnston CC, Buxton Bf. Inhibition by a stable factor derived from neutrophils of endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Am J Physiol* 1993; 265: H-1454-H-1459.
 71. Rovira I. Óxido nítrico. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 1995; 42: 15-23.
 72. Anderson TJ, Meredith IT, Ganz P, Selwyn AP, Yeung AC. Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences and potential interactions. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 555-566.
 73. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-853.
 74. Hampl V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK. Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1748-1757.
 75. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood K, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237: 893-900.

-
76. Knight DR, Shen YT, Young MA, Vatner SF. Acetylcholine-induced coronary vasoconstriction and vasodilation in tranquilized baboons. *Circ Res* 1991; 69: 706-713.
 77. Burnstock G. Vascular control by purines with emphasis on the coronary system. *Eur heart J* 1989; 10: F-15-F-21.
 78. Leusen I, VandeVoorde J. Endothelium-dependent responses to histamine. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium*. Nueva York: Raven Press Ltd, 1988; 469-474.
 79. Suzuki H, Chen G, Yamamoto Y. Endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF). *Jpn Circ J* 1992; 56: 170-174.
 80. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993; 92: 2867-2871.
 81. Weintraub NL, Stephenson AH, Sprague RS, McMurdo L, Lonigro AJ. Relationship of arachidonic acid release to porcine coronary artery relaxation. *Hypertension* 1995; 26: 684-690.
 82. Nagao T, Vanhoutte PM. Endothelium derived hyperpolarizing factor and endothelium dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 1-6.
 83. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-3349.
 84. Mombouli JV, Bissiriou I, Agboton VD, Vanhoutte PM. Bioassay of endothelium derived hyperpolarizing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 484-488.
 85. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996; 78: 415-423.

-
86. Hammarstrom AK, Parkington HC, Coleman HA. Release of endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) by M3 receptor stimulation in guinea pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 717-722.
 87. Eizawa H, Yui Y, Inoue R, Kosuga K, Hattori R, Aoyama T, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium dependent hyperpolarization and N omega nitro L arginine/indomethacin resistant endothelium dependent relaxation in the porcine coronary artery. *Circulation* 1995; 92: 3520-3526.
 88. Lischke V, Busse R, Hecker M. Inhalation anesthetics inhibit the release of endothelium derived hyperpolarizing factor in the rabbit carotid artery. *Anesthesiology* 1995; 83: 574-582.
 89. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Mitsui Y, Kobayashi M, Watanabe TX, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 331: 411-415.
 90. Lüscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Noll G, Dohi Y. Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87: V-36-V-44.
 91. Lin PJ, Pearson PJ, Chang CH. Endothelium derived contracting factors. *Chang Keng I Hsueh* 1993; 16: 140-153.
 92. Masaki T. Overview: Reduced sensitivity of vascular response to endothelin. *Circulation* 1993; 87: V-33-V-35.
 93. Clevell A, Stingo A, Margulies K, Lerman A, Underwood D, Burnett JC Jr. Physiological significance of endothelin: Its role in congestive heart failure. *Circulation* 1993; 87: V-45-V-50.
 94. Jino H, Usui H, Temma S, Shirahase H, Kurahashi K. An endothelium dependent contraction in canine mesenteric artery caused by caffeine. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 435-438.

95. Mathew R, Zeballos GA, Tun H, Gewitz MH. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 739-746.
96. Donckier J, Stoleru L, Hayashida W, VanMechelen H, Selvais P, Galanti L, et al. Role of endothelin-1 in experimental renal hypertension in dogs. *Circulation* 1995; 92: 106-113.
97. Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1995; 92: 114-119.
98. Johns RA, Peach MJ. Metabolism of arachidonic acid and release of endothelium-derived relaxing factors. En: Vanhoutte PM, editor. *Relaxing and contracting factors*. Clifton: The Humana Press Inc, 1988; 65-83.
99. Moncada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ. Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium*. Nueva York: Raven Press Ltd, 1988; 415-420.
100. Bassenge E. Antiplatelet effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide donors. *Eur Heart J* 1991; 12: E-12-E-15.
101. Yang Z, Stulz P, vonSegesser L. Different interactions of platelets with arterial and venous coronary bypass vessels. *Lancet* 1991; 337: 939-943.
102. Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive cell ADPase. *J Clin Invest* 1991; 88: 1690-1696.
103. Houston DS, Vanhoutte PM. Platelets and endothelium-dependent responses. En: Vanhoutte PM, editor. *Relaxing and contracting factors*. Clifton: The Humana Press Inc, 1988; 425-442.

-
104. DeMey JG. Atrial natriuretic peptides and blood pressure. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium*. Nueva York: Raven Press Ltd, 1988; 123-128.
 105. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin generelated peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313: 54-56.
 106. Nakamura Y, Parent R, Lavallée M. Disparate effects of substance P on systemic and coronary beds in conscious dogs. *Circulation* 1991; 84: 300-312.
 107. Beavo JA, Reifsnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *T I P S* 1990; 11: 150-155.
 108. Lugnier C, Komasa N. Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 1993; 14: I-141-I-148.
 109. Saeki T, Saito I. Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochemical Pharmacol* 1993; 46: 833-839.
 110. Ahn Ho-Sam, Foster M, Arik L, Boykow G, Foster C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in rat mensangial cells. *Eur J Pharmacol Molec Pharmacol Section* 1995; 289: 49-57.
 111. Burnstock G, Ralevic V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plastic Surg* 1994; 47: 527-543.
 112. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter ?. *Neuroscience* 1976; 1: 239-248.
 113. Ralevic V, Burnstock G. Neural endothelial interactions in the control of local vascular tone. Tejas: Landes Publising Co., 1993.

-
114. Burnstock G. Co-transmission. The Fifth Heymans Lecture, Ghent. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1990; 304: 7-33.
 115. Kupfermann I. Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 1991; 71: 683-732.
 116. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
 117. Rubino A, Ralevic V, Burnstock G. The P₁-purinoceptors that mediate the prejunctional effect of adenosine on capsaicin-sensitive non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed are of the A₁ subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 1100-1104.
 118. Hassal CJS, Burnstock G. Intrinsic neurones and associated cells of the guinea-pig heart in culture. *Brain Res* 1986; 364: 102-113.
 119. Rand MJ. Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19: 147-169.
 120. Holmberg S. Acute heart failure. En: Julian DG, Camm AJ, Fox KM, Hall RJ, Poole-Wilson PA, editores. *Diseases of the heart*. Londres: WB Saunders Co, 1996; 456-466.
 121. Thys DM, Kaplan JA. Cardiovascular physiology. En: Miller RD, editor. *Anesthesia*. Nueva York: Churchill Livingstone Inc, 1990; 551-584.
 122. Balboa F. Insuficiencia cardíaca. En: Casado E, Nogales A, editores. *Pediatría*. Madrid: Gráficas Clarión SA, 1991; 815-820.
 123. Wray DL, Fine RH, Hughes CW, Thomas S. Anesthesia for cardiac surgery. En: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, editores. *Clinical anesthesia*. Filadelfia: JB Lippincott Company, 1992; 1021-1057.

-
124. Levy JH, Salmenperä MT, Bailey JM. Postoperative circulatory control. En: Kaplan JA, editor. Cardiac anesthesia. Filadelfia: Saunders, 1993; 1168-1193.
 125. Kaplan JA. Pathophysiology of the perioperative low output syndrome. *Eur J Anesthesiol* 1992; 5: 3-6.
 126. Grossman W. Diastolic dysfunction in heart failure. *Circulation* 1990; 81: III-1-III-7.
 127. Morgan HE. Cellular aspects of cardiac failure. *Circulation* 1993; 87: IV-4-IV-6.
 128. Swedberg K. Reduction in mortality by pharmacological therapy in congestive heart failure. *Circulation* 1993; 87: IV-126-IV-129.
 129. Yusuf S, Garg R. Design, results, and interpretation of randomized, controlled trials in congestive heart failure and left ventricular dysfunction. *Circulation* 1993; 87: VII-115-VII-121.
 130. DeMeijer PH. Digitalis in congestive heart failure. *Neth J Med* 1994; 45: 225-232.
 131. Tauke J, Goldstein S, Gheorghide M. Digoxin for chronic heart failure: a review of the randomized controlled trials with special attention to the PROVED (Prospective Randomized Study of Ventricular Failure and the Efficacy of Digoxin) and RADIANCE (Randomized Assessment of Digoxin on Inhibitors of the angiotensin Converting Enzyme) trials. *Prog Cardiovasc Dis* 1994; 37: 49-58.
 132. Morisco C, Cuocolo A, Romano M, Nappi A, Iaccarino G, Volpe M, et al. Influence of digitalis on left ventricular functional response to exercise in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1996; 77: 480-485.
 133. Erdmann E. Digitalis--friend or foe?. *Eur Heart J* 1995; 16: 16-19.
 134. Jockers R, DaSilva A, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. New molecular and structural determinants involved in beta 2-adrenergic

- receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 9355-9362.
135. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res* 1996; 78: 737-749.
136. Urasawa K, Yoshida I, Takagi C, Onozuka H, Mikami T, Kawaguchi H, et al. Enhanced expression of beta-adrenergic receptor kinase 1 in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters, BIO53.58. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 26-30.
137. Rockman HA, Hamilton RA, Jones LR, Milano CA, Mao L, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial relaxation in vivo in transgenic mice overexpressing the beta2-adrenergic receptor is associated with reduced phospholamban protein. *J Clin Invest* 1996; 97: 1618-1623.
138. Elwan MA, Soliman MR. Alteration of D1 and D2 dopaminergic receptor kinetics in specific rat brain regions following repeated administration of opiates. *Pharmacology* 1995; 51: 73-83.
139. Zarrindast MR, Bayat A, Shafaghi B. Involvement of dopaminergic receptor subtypes in straub tail behaviour in mice. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 127-130.
140. Miall-Allen VM, Whitelaw AG. Response to dopamine and dobutamine in the preterm infant less than 30 weeks gestation. *Crit Care Med* 1989; 17: 1166-1169.
141. Lieverse AG, Lefrandt JD, Girbes AR, Smit AJ, Reitsma WD. The effects of different doses of dopamine and domperidone on increases of plasma norepinephrine induced by cold pressor test in normal man. *Hypertens Res* 1995; 18: S-221-S-224.
142. Haneda T, Okamoto K, Hiroshima T, Kashiwagi Y, Miyata S, Ohi S, et-al. The role of renal dopamine in the reduction of high blood pressure by beta 1-selective beta-blocker with intrinsic

-
- sympathomimetic activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 1995; 18: S-215-S-219.
143. Habuchi Y, Lu LL, Komori T, Okamoto S, Nishimura M, Morikawa J, et al. Does dopamine act on myocardial cells?. *Hypertens Res* 1995; 18: S-157-S-159.
144. Kinoshita G, Washizu M, Murata N, Kondo M, Matsukura Y, Washizu T, et al. The selective effects of dopamine and dobutamine on liver circulation in the dog. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 293-297.
145. Nishikawa K, Yabe M, Mori T, Terai T, Yukioka H, Fujimori M. The effects of dobutamine and phenylephrine on atrioventricular conduction during combined use of halothane and thoracic epidural lidocaine. *Anesth Analg* 1996; 82: 551-557.
146. Priebe HJ, Noldge GF, Armbruster K, Geiger K. Differential effects of dobutamine, dopamine, and noradrenaline on splanchnic haemodynamics and oxygenation in the pig. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 1088-1096.
147. Vantrimpont PJ, Felice H, Paulus WJ. Does dobutamine prevent the rise in left ventricular filling pressures observed during exercise after heart transplantation?. *Eur Heart J* 1995; 16: 1300-1306.
148. Gilbert EM, Hershberger RE, Wiechmann RJ, Movsesian MA, Bristow MR. Pharmacologic and hemodynamic effects of combined beta agonist stimulation and phosphodiesterase inhibition in the failing human heart. *Chest* 1995; 108: 1524-1532.
149. Nagata K, Iwase M, Sobue T, Yokota M. Differential effects of dobutamine and a phosphodiesterase inhibitor on early diastolic filling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 295-304.
150. Marcus MA, Vertommen JD, Van Aken H, Wouters PF. Hemodynamic effects of intravenous isoproterenol versus epinephrine

-
- in the chronic maternal fetal sheep preparation. *Anesth Analg* 1996; 82: 1023-1026.
151. Arieli R, Ben Haim SA, Bomzon A, Hayam G, Zamir N. Aviat Epinephrine dose response of the isolated working heart in O₂ exposed rats. *Space Environ Med* 1995; 66: 1071-1078.
152. Frazier CA. Epinephrine for anaphylaxis. *Nebr Med J* 1996; 81: 6-7.
153. Jaffe R, Weiss AT, Rosenheck S. Combined isoproterenol and epinephrine for the resuscitation of patients with cardiac asystole secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996; 77: 194-195.
154. Tang W, Weil MH, Sun S, Noc M, Yang L, Gazmuri RJ. Epinephrine increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation* 1995; 92: 3089-3093.
155. Wu JR, Chang HR, Huang TY, Chen SS. Increased plasma norepinephrine levels in infants and children with congestive heart failure. *Acta Paediatr Sin* 1995; 36: 351-356.
156. Anderson KE, Lambert KA, Woodcock EA. The norepinephrine stimulated inositol phosphate response in human atria. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2415-2419.
157. Golba KS, Deja M, Wos S, Bachowski R, Szalanski P, Mrozek R, et al. Reactivity of isolated human right atria to norepinephrine in various disease states. *J Physiol Pharmacol* 1995; 46: 323-328.
158. Sato K, Sawada M, Kojima M, Dohi Y. Biphasic pressor responses to norepinephrine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58: 583-587.
159. Patrick WD, Freedman J, McEwen T, Light RB, Ludwig L, Roberts D. A randomized, double-blind comparison of methoxamine and epinephrine in human cardiopulmonary arrest. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 519-523.

-
160. Chambers FA, O'Toole DP, Corcoran MO, Keane PW. Effects of preoperative methoxamine on blood loss and haemodynamic variables during transurethral prostatic resection under spinal anaesthesia. *Br J Anaesth* 1994; 73: 624-627.
 161. Yang HT, Endoh M. Dissociation of the positive inotropic effect of methoxamine from the hydrolysis of phosphoinositide in rabbit ventricular myocardium: a comparison with the effects of phenylephrine and the subtype of the alpha-1 adrenoceptor involved. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 732-742.
 162. McKnight JA, Rooney DP, Whitehead H, Atkinson AB. Blood pressure responses to phenylephrine infusions in subjects with Cushing's syndrome. *J Hum Hypertens* 1995; 9: 855-858.
 163. Miller JA, Dacey RG Jr, Diringer MN. Safety of hypertensive hypervolemic therapy with phenylephrine in the treatment of delayed ischemic deficits after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1995; 26: 2260-2266.
 164. Talwar A, Hussain ME, Gupta CK, Fahim M. Cardiovascular responses to phenylephrine during acute experimental anaemia in anaesthetized cats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1995; 39: 1006-1010.
 165. Kirstein M, Eickhorn R, Kochsiek K, Langenfeld H. Dose dependent alteration of rat cardiac sodium current by isoproterenol: results from direct measurements on multicellular preparations. *Pflugers Arch* 1996; 431: 395-401.
 166. Ohtani H, Yamamoto K, Sawada Y, Iga T. Antibronchospasmic, tachycardiac, and hypokalaemic effects of L isoproterenol in guinea pigs. *Biopharm Drug Dispos* 1995; 16: 745-753.
 167. Hotta Y, Ando H, Fujita M, Nakagawa J, Takeya K, Sakakibara J. Different effects of isoproterenol and dihydroouabain on cardiac Ca²⁺ transients. *Eur J Pharmacol* 1995; 282: 121-130.

-
168. Poderoso JJ, Fernández S, Carreras MC, Del Bosco CG, Boveris A. Isoproterenol dependent decrease in oxygen uptake and respiratory enzyme activities in rat myocardial tissue and mitochondria. *Crit Care Med* 1995; 23: 1726-1733.
 169. Kikura M, Levy JH. New cardiac drugs. *Int Anesthesiol Clin* 1995; 33: 21-37.
 170. Hannemann L, Reinhart K, Meier Hellmann A, Wallenfang G, Bredle DL. Dopexamine hydrochloride in septic shock. *Chest* 1996; 109: 756-760.
 171. Welch M, Newstead CG, Smyth JV, Dodd PD, Walker MG. Evaluation of dopexamine hydrochloride as a renoprotective agent during aortic surgery. *Ann Vasc Surg* 1995; 9: 488-492.
 172. Boyd O, Lamb G, Mackay CJ, Grounds RM, Bennett ED. A comparison of the efficacy of dopexamine and dobutamine for increasing oxygen delivery in high risk surgical patients. *Anaesth Intensive Care* 1995; 23: 478-484.
 173. Lund N, de Asla RJ, Cladis F, Papadakos PJ, Thorborg PA. Dopexamine hydrochloride in septic shock: effects on oxygen delivery and oxygenation of gut, liver, and muscle. *J Trauma* 1995; 38: 767-775.
 174. MacGregor DA, Butterworth JF 4th, Zaloga CP, Prielipp RC, James R, Royster RL. Hemodynamic and renal effects of dopexamine and dobutamine in patients with reduced cardiac output following coronary artery bypass grafting. *Chest* 1994; 106: 835-841.
 175. Goenen M. Historical perspectives and update of amrinone. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1989; 3: II-15-II-23.
 176. Levy JH, Bailey JM. Perioperative experience with amrinone. *Eur J Anaesthesiol* 1992; 5: 15-19.

-
177. Butterworth JF 4th. Use of amrinone in cardiac surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1993; 7: I-1-I-7.
 178. Sorensen GK, Ramamoorthy C, Lynn AM, French J, Stevenson JG. Hemodynamic effects of amrinone in children after Fontan surgery. *Anesth Analg* 1996; 82: 241-246.
 179. Dentz ME, Lubarsky DA, Smith LR, McCann RL, Moskop RJ, Inge W, et al. A comparison of amrinone with sodium nitroprusside for control of hemodynamics during infrarenal abdominal aortic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995; 9: 486-490.
 180. Lee TS, Hou X. Comparative vasoactive effects of amrinone on systemic and pulmonary arteries in rabbits. *Chest* 1995; 108: 1364-1367.
 181. Konstam MA, Cody RJ. Short term use of intravenous milrinone for heart failure. *Am J Cardiol* 1995; 75: 822-826.
 182. Takalo R, Malminiemi K, Wuorela H, Vuorinen P, Metsa Ketela T. Second derivative of developed tension in classifying cardiotonics with respect to their mechanisms of action: drugs affecting cAMP metabolism. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70: 105-110.
 183. Schmitz W, Eschenhagen T, Mende U, Muller FU, Neumann J, Scholz H. Phosphodiesterase inhibition and positive inotropy in failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 1992; 87: I-65-I-71.
 184. Frodsham G, Jones RB. Effect of flosequinan upon isoenzymes of phosphodiesterase from guinea pig cardiac and vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1992; 211: 383-391.
 185. Schwinger RH, Bohm M, LaRosee K, Schmidt U, Erdmann E. Effect of the phosphodiesterase inhibitor UK 61260 on human myocardial inotropy and diastolic relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 966-974.

-
186. Arbogast R. Effets des inhibiteurs de la phosphodiesterase sur la fonction diastolique. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1993; 86: 65-69.
 187. Weishaar RE, Kirker ML, Wallace AM, Ferraris VA, Britton LW 2d, Sim MF. Relationship between inotropic activity and phosphodiesterase inhibition for flosequinan and milrinone. *Eur J Pharmacol* 1993; 236: 363-366.
 188. Rump AF, Acar D, Klaus W. A quantitative comparison of functional and anti ischaemic effects of the phosphodiesterase inhibitors, amrinone, milrinone and levosimendan in rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 757-762.
 189. Akita T, Joyner RW, Lu C, Kumar R, Hartzell HC. Developmental changes in modulation of calcium currents of rabbit ventricular cells by phosphodiesterase inhibitors. *Circulation* 1994; 90: 469-478.
 190. Morner SE, Arlock P. Mechanical and electrophysiological effects of milrinone on the force frequency relationship in mammalian myocardium. *Acta Physiol Scand* 1994; 150: 125-132.
 191. Polla B, Cappelli V, Canepari M, Zanardi MC, Reggiani C. Direct depressant effect of phosphodiesterase inhibitors on ATPase activity of rat cardiac myofibrils. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 661-664.
 192. Rascon A, Lindgren S, Stavenow L, Belfrage P, Andersson KE, Manganiello VC, et al. Purification and properties of the cGMP inhibited cAMP phosphodiesterase from bovine aortic smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1134: 149-156.
 193. Ortiz JL, Cortijo J, Valles JM, Morcillo EJ. Rolipram inhibits PAF induced airway microvascular leakage in guinea pig: a comparison with milrinone and theophylline. *Fundam Clin Pharmacol* 1992; 6: 247-249.
 194. Nicholson CD, Shahid M, Bruin J, Barron E, Spiers I, de Boer J, et al. Characterization of ORG 20241, a combined phosphodiesterase IV/III

-
- cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor for asthma. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 678-687.
195. Barradas MA, Jagroop A, O'Donoghue S, Jeremy JY, Mikhailidis DP. Effect of milrinone in human platelet shape change, aggregation and thromboxane A2 synthesis: an in vitro study. *Thromb Res* 1993; 71: 227-236.
196. Roevens P, DeChaffoy F, DeCourcelles D. Cyclic AMP phosphodiesterase IIIA1 inhibitors decrease cytosolic Ca²⁺ concentration and increase the Ca²⁺ content of intracellular storage sites in human platelets. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2279-2282.
197. Jeremy JY, Gill J, Mikhailidis D. Effect of milrinone on thromboxane A2 synthesis, cAMP phosphodiesterase and ⁴⁵Ca²⁺ uptake by human platelets. *Eur J Pharmacol* 1993; 245: 67-73.
198. Tang KM, Jang EK, Haslam RJ. Photoaffinity labelling of cyclic GMP inhibited phosphodiesterase (PDE III) in human and rat platelets and rat tissues: effects of phosphodiesterase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 105-114.
199. Kikura M, Lee MK, Safon RA, Bailey JM, Levy JH. The effects of milrinone on platelets in patients undergoing cardiac surgery. *Anesth Analg* 1995; 81: 44-48.
200. Lagente V, Moodley I, Perrin S, Mottin G, Junien JL. Effects of isozyme selective phosphodiesterase inhibitors on eosinophil infiltration in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 1994; 255: 253-256.
201. Lagente V, Pruniaux MP, Junien JL, Moodley I. Modulation of cytokine induced eosinophil infiltration by phosphodiesterase inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1720-1724.
202. Masaki Y, Sato W, Kayaba M, Enzan K, Suzuki M. Milrinone suppresses TNF alpha and IL 1 beta release in mouse peritoneal macrophages. *Masui* 1995; 44: 800-804.

-
203. Derian CK, Santulli RJ, Rao PE, Solomon HF, Barrett JA. Inhibition of chemotactic peptide induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J Immunol* 1995; 154: 308-317.
 204. DeHert SG, Moens MM, Jorens PG, Delrue GL, DePaep RJ, Vermeyen KM. Comparison of two different loading doses of milrinone for weaning from cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995; 9: 264-271.
 205. Honerjager P, Nawrath H. Pharmacology of bipyridine phosphodiesterase III inhibitors. *Eur J Anaesthesiol* 1992; 5: 7-14.
 206. Monrad ES, McKay RG, Baim DS, Colucci WS, Fifer MA, Heller GV, et al. Improvement in indexes of diastolic performance in patients with congestive heart failure treated with milrinone. *Circulation* 1984; 70: 1030-1037.
 207. Vila-Petroff M, Vittone L, Mundina C, Chiappe G, Alicia M. Positive lusitropic effect and diminished myofibrillar sensitivity to calcium produced by cAMP on toad (*Bufo arenarum* Hensel) ventricle. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1992; 42: 61-73.
 208. Grose R, Strain J, Greenberg M, LeJemtel TH. Systemic and coronary effects of intravenous milrinone and dobutamine in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 1107-1113.
 209. Monrad ES, Baim DS, Smith HS, Lanoue AS. Milrinone, dobutamine, and nitroprusside: comparative effects on hemodynamics and myocardial energetics in patients with severe congestive heart failure. *Circulation* 1986; 73: III-168-III-174.
 210. Butterwoth JF, Hines RL, Royster RL, James RL. A pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of milrinone in adults undergoing. *Anesth Analg* 1995; 81: 783-792.
 211. Lebedinsky Y, Nordstrom ST, Aschoff SE, Kapples JF, O'Malley GJ, Kosley RW Jr, et al. Cardiotonic and coronary vasodilator responses to

-
- milrinone, forskolin, and analog P87 7692 in the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 779-789.
212. Boesch C, Dubois JL, Pochmalicki G, Lellouche D, Teiger E, Saal JP, et al. Etude hemodynamique de la milrinone par voie intraveineuse chez 26 patients en insuffisance cardiaque de classe III ou IV de la NYHA. *Ann Cardiol Angeiol Paris* 1992; 41: 509-512.
213. Colucci WS, Sonnenblick EH, Adams KF, Berk M, Brozena SC, Cowley AJ, et al. Efficacy of phosphodiesterase inhibition with milrinone in combination with converting enzyme inhibitors in patients with heart failure. The Milrinone Multicenter Trials Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: A-113-A-118.
214. Nanimatsu H, Saikawa T, Maeda T, Fukuoka Y, Takaki R. Hemodynamic effects of milrinone in patients with congestive heart failure short and long term follow up studies. *Jpn Circ J* 1993; 57: 91-101.
215. Hirakawa S, Ito H, Sahashi T, Takai K, Wada H. Effects of milrinone on systemic capacitance vessels in relation to venous return and right ventricular pump function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 96-101.
216. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 1991; 325: 1468-1475.
217. Goldstein RA, Geraci SA, Gray EL, Rinkenberger RL, Dougherty AH, Naccarelli GV. Electrophysiologic effects of milrinone in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1986; 57: 624-628.
218. Tisdale JE, Patel R, Webb CR, Borzak S, Zarowitz BJ. Electrophysiologic and proarrhythmic effects of intravenous inotropic agents. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 167-180.
219. Duthie DJ, Woolman PS, Doyle AR. Enoximone and warming after hypothermic cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* 1995; 75: 43-46.

220. Zwolfer W, Dressler HT, Keznickl P, Dieterich HA. Enoximone versus epinephrine/nitroglycerin in cardiac low output states following valve replacement. *Clin Cardiol* 1995; 18: 145-149.
221. Morita S, Sawai Y, Heeg JF, Koike Y. Pharmacokinetics of enoximone after various intravenous administrations to healthy volunteers. *J Pharm Sci* 1995; 84: 152-157.
222. Dubrey SW, Gnanasakthy A, Stein WK, Song JG, Hardman T, Hynd J, et al. Enoximone in chronic stable angina: a double blind placebo controlled cross over trial. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23: 532-538.
223. Boldt J, Knothe C, Zickmann B, Ballesteros M, Russ W, Dapper F, Hempelmann G. The role of enoximone in cardiac surgery. *Br J Anaesth* 1992; 69: 45-50.
224. Vincent JL, Leon M, Berre J, Melot C, Kahn RJ Addition of enoximone to adrenergic agents in the management of severe heart failure. *Crit care Med* 1992; 20: 1102-1106.
225. Berg Candolfi M, Dulery B, Jehl F, Haegele KD. Metabolism and pharmacokinetics of the cardiotonic agent piroximone and of its major metabolite in dog. *Xenobiotica* 1995; 25: 59-70.
226. Fauvel JP, Bernard N, Laville M, Pozet N, Sassard J, Zech PY. Pharmacokinetics of piroximone after oral and intravenous administration to patients with renal insufficiency. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 39: 187-189.
227. Saal JP, Habbal R, Estagnasie P, Lellouche D, Castaigne A, Dubois Rande JL Effects of piroximone on the right ventricular function in severe heart failure patients. *Intensive Care Med* 1994; 20: 341-347.
228. Albo C, Saal JP, Lellouche D, Habbal R, Benvenuti C, Deleuze P, et al. Additive haemodynamic effects of piroximone and prostacyclin in severe chronic heart failure. *Eur Heart J* 1994; 15: 528-533.

-
229. Zwolfer W, Podesser B, Wollenek G, Zegner M, Haider W. Postischemic hemodynamic changes after piroximone administration in isolated rabbit heart. *Eur Surg Res* 1994; 26: 141-148.
230. Heber D, Heers C, Ravens U. Positive inotropic activity of 5-amino-6-cyano-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrido[2,3-d] pyrimidine-2,4-dione in cardiac muscle from guinea pig and man. Part 6: Compounds with positive inotropic activity. *Pharmazie* 1993; 48: 537-541.
231. Mochizuki N, Uchida S, Miyata H. Cardiovascular effects of NSP 804 and NSP 805, novel cardiostimulant agents with vasodilator properties. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 983-995.
232. Bethke T, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Wenzlaff H, Armah BI, et al. High selectivity for inhibition of phosphodiesterase III and positive inotropic effects of MCI 154 in guinea pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 847-855.
233. Li Q, Himmel HM, Ravens U. Effects of the new phosphodiesterase III inhibitor R80122 on contractility and calcium current in human cardiac tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 133-143.
234. Dorigo P, Fraccarollo D, Santostasi G, Gaion RM, Maragno I, Floreani M, et al. Pharmacological characterization of a new milrinone analogue. *Farmaco* 1994; 49: 19-23.
235. Singh B, Bacon ER, Robinson S, Fritz RK, Leshner GY, Kumar V, et al. Novel cAMP PDE III inhibitors: imidazo[4,5 b]pyridin-2(3H)-ones and thiazolo[4,5 b]pyridin-2(3H)-ones and their analogs. *J Med Chem* 1994; 37: 248-254.
236. Singh B, Bacon ER, Leshner GY, Robinson S, Pennock PO, Bode DC, et al. Novel and potent adenosine 3',5' cyclic-phosphate phosphodiesterase III inhibitors: thiazolo[4,5 b][1,6]naphthyridin-2-ones. *J Med Chem* 1995; 38: 2546-2550.
237. Dundore RL, Pagani ED, Bode DC, Bacon ER, Singh B, Leshner GY, et al. Species dependent pharmacodynamic effects of the selective low

-
- Km cyclic AMP phosphodiesterase III inhibitors WIN 58993 and WIN 62005. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 14-21.
238. Lindgren S, Andersson KE. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on isolated coronary, lung and renal arteries from man and rat. *Acta Physiol Scand* 1991; 142: 77-82.
239. Salmenperä M, Levy JH. The *in vitro* effects of phosphodiesterase inhibitors on the human internal mammary artery. *Anesth Analg* 1996; 82: 954-957.
240. Furchgott RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2: 173-176.
241. Altieri RJ, Travis DC, Thompson DC. Characterization of acetylcholinesterase in rabbit intrapulmonary arteries. *Am J Physiol* 1994; 267: L-745-L-752.
242. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051.
243. Altieri RJ, Kiritsy-Roy JA, Catravas JD. Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A₂. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 535-541.
244. Altieri RJ, Thompson DC. Modulation of cholinergic responses by N^o-nitro-L-arginine in rabbit intrapulmonary arteries. *Pulm Pharmacol* 1992; 5: 149-151.
245. Tejerina T, Sesin J, Delgado C, Tamargo J. Effect of milrinone on contractility and ⁴⁵Ca movements in the isolated rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1988; 148: 239-246.
246. Defeo TT, Feldman M, Morgan JP, Thurer R, Weintraub R, Schoen F, et al. Vasodilatory potency of milrinone on human coronary arteries. *Circulation* 1985; 72: III-403.

247. Lindgren S, Andersson KE, Belfrage P, Degerman E, Manganiello VC. Relaxant effects of the selective phosphodiesterase inhibitors milrinone and OPC 3911 on isolated human mesenteric vessels. *Pharmacol Toxicol* 1989; 64: 440-445.
248. Harris AL, Grant AM, Silver PJ, Evans DB, Alousi AA. Differential vasorelaxant effects of milrinone and amrinone on contractile responses of canine coronary, cerebral, and renal arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: 238-244.
249. Harbison RG, Lipton HL, Hyman AL, Kadowitz PJ. Pulmonary vascular actions of amrinone and milrinone. *Circulation* 1984; 70: II-182.
250. Rossing TH, Dorazen JM. Effects of milrinone on contractile responses of quinea pig trachea, lung parenchyma and pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 874-879.
251. Tajimi K, Tanaka H, Kasai T, Kobayashi K, Okuaki A. Selective pulmonary vasodilatory effects of ZSY-27 in dogs with pulmonary hypertension due to pulmonary embolism. *Crit Care Med* 1989; 17: 163.
252. Tanaka H, Tajimi K, Matsumoto A, Kobayash K. Vasodilatory effects of milrinone on pulmonary vasculature in dogs with pulmonary hypertension due to pulmonary embolism: a comparison with those of dopamine and dobutamine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990; 17: 681-690.
253. Tanaka H, Tajimi K, Moritsune O, Kobayashi K, Okada K. Effects of milrinone on pulmonary vasculature in normal dogs and in dogs with pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 1991; 19: 68-74.
254. Tanaka H, Tajimi K, Matsumoto A, Kobayashi K. Effects of milrinone on lung water content in dogs with acute pulmonary hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992; 28: 201-208.

-
255. Feneck RO. Milrinone and postoperative pulmonary hypertension. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1993; 7: I-21-I-23.
 256. Scott-Monrad E, Baim DS, Smith H, Lanque ARN, Braunwald E, Grossman W. Effects of milrinone on coronary hemodynamics and myocardial energetics in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1985; 71: 972-979.
 257. Eichorn EJ, Konstam MA, Weiland DS, Roberts DJ, Martin TT, Stransky NB, et al. Differential effects of milrinone and dobutamine on right ventricular preload, afterload and systolic performance in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1987; 60: 1329-1333.
 258. Mager G, Klocke RK, Kux A, Höpp HW, Hilger HH. Phosphodiesterase inhibition or adrenoceptor stimulation: Milrinone as an alternative to dobutamine in the treatment of severe heart failure. *Am Heart J* 1991; 121: 1974-1983.
 259. Batet MC. Utilidad de la milrinona versus dopamina-nitroglicerina en pacientes sometidos a cirugía cardíaca bajo circulación extracorpórea. Barcelona: Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina, 1995.
 260. Clarke WR, Uezono S, Chambers A, Doepfner P. The type III phosphodiesterase inhibitor milrinone and type V PDE inhibitor dipyridamole individually and synergistically reduce elevated pulmonary vascular resistance. *Pulm Pharmacol* 1994; 7: 81-89.
 261. Harris MN, Daborn AK, O'Dwyer JP. Milrinone and the pulmonary vascular system. *Eur J Anaesthesiol* 1992; 5: S-27-S-30.
 262. Remme WJ, van-Hoogenhuyze DC, Kruijssen HA, Pieper PG, Bruggeling WA. Preload-dependent hemodynamic effects of milrinone in moderate heart failure. *Cardiology* 1992; 80: 132-142.
 263. Remme WJ. Inodilator therapy for heart failure. Early, late, or not at all?. *Circulation* 1993; 87: IV-97-IV-107.