

ENDOTELINA, UN NUEVO PEPTIDO REGULADOR CARDIOVASCULAR.

Un estudio en 58 pacientes con diferentes patologías
con el nexo común de daño endotelial.

Vicente Estrada Pérez.
Universidad Complutense.
Madrid, 1993.

D. ARTURO FERNANDEZ CRUZ, CATEDRATICO DE PATOLOGIA GENERAL Y PROPEDEUTICA CLINICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que D. Vicente Estrada Pérez, licenciado en Medicina y Cirugía y Especialista en Medicina Interna, ha realizado en el Hospital Universitario San Carlos y bajo mi dirección el trabajo realizado:

Endotelina, un nuevo péptido regulador cardiovascular.

Este trabajo reúne los requisitos exigibles para ser presentado como Tesis para aspirar al Título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, firmo el presente en Madrid a 19 de Octubre de 1993.



Fdo.: Profesor Fernández Cruz.



INDICE

- A. Agradecimientos.
- B. Introducción.
 - B.1. Factores vasodilatadores derivados del endotelio.
 - B.2. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio.
Endotelina.
 - B.2.a. Control de la secrección de Endotelina.
 - B.2.b. Mecanismo de acción.
 - B.2.c. Efectos biológicos.
 - B.2.d. Acciones cardiovasculares.
 - B.2.e. Acciones pulmonares.
 - B.2.f. Acciones renales.
 - B.2.g. Acciones endocrinológicas.
 - B.2.h. Acciones neurológicas.
 - B.2.i. Otras acciones biológicas.
 - B.2.j. Situaciones clínicas con posible implicación de la Endotelina.
- C. Objetivos del proyecto.
- D. Material; protocolos de estudio.
 - D.1. Clampaje aórtico infrarrenal.
 - D.2. Angioplastia coronaria-angina inestable.
 - D.3. Infarto agudo de miocardio.
 - D.4. Accidente vascular cerebral isquémico.
 - D.5. Sepsis.
- E. Métodos.
 - E.1. Determinación de Endotelina.
 - E.2. Determinación de ANF.
 - E.3. Determinación de Renina.
 - E.4. Determinación de C3d.
 - E.5. Análisis estadístico.
- F. Resultados.
 - F.1. Clampaje aórtico infrarrenal.
 - F.2. Angioplastia coronaria-angina inestable.
 - F.3. Infarto agudo de miocardio.
 - F.4. Accidente vascular cerebral isquémico.
 - F.5. Sepsis.

G. Discusión.

- G.1. Clampaje aórtico infrarrenal.
- G.2. Angioplastia coronaria-angina inestable.
- G.3. Infarto agudo de miocardio.
- G.4. Accidente vascular cerebral isquémico.
- G.5. Sepsis.

H. Resumen de los estudios clínicos.

I. Conclusiones.

J. Bibliografía.

Agradecimientos

Al Profesor Fernández Cruz, impulsor de la idea de investigación sobre Endotelina. Durante el tiempo de realización de la Tesis fui Residente de Medicina Interna de su Servicio y aprendí de él Medicina, y gracias a él me familiaricé con la investigación clínica en el ámbito de la enfermedades cardiovasculares, de las que es líder de opinión de reconocimiento internacional. Sin su apoyo y comprensión no hubiera sido posible la realización de ésta Tesis.

Al Laboratorio de Diabetes y Obesidad del Servicio de Medicina Interna 3, dirigido por la Dra. Fernández Durango, y en particular al Dr. Moya y al Dr. Bagazgoitia, quienes realizaron los radioinmunoensayos de Endotelina y Factor natriurético auricular, así como el inmunoanálisis de la concentración de renina activa.

Al Laboratorio de Inmunología, especialmente al Prof. Patiño y la Dra. Figueiredo, por la realización del ELISA de la fracción 3d del sistema del complemento.

Al Laboratorio de Nefrología de la Fundación Jimenez Díaz, en particular al Prof. López Novoa y al Dr. López Farré, por su orientación constructiva en el desarrollo de los diferentes protocolos.

Al Prof. Matesanz y a los Dres. Varela de Seijas, Macaya y Martín Santos, de los Servicios de Cirugía Vasculat, Cardiopulmonar y UCI, por la colaboración en la recogida de pacientes.

B. Introducción.

El conocimiento de la relevancia del endotelio en todos los aspectos de la fisiología ha significado un marcado avance en el progreso médico de los últimos años. La profundización en la investigación endotelial ha revolucionado ideas con respecto al control del flujo sanguíneo, la presión arterial o el sistema de coagulación, así como en la patogénesis de la placa de ateroma, las vasculitis, el síndrome de distress respiratorio o el control del crecimiento tumoral.

El papel endocrinológico del endotelio vascular, y su capacidad de participar en la homeostasis cardiovascular ha sido objeto de intensa investigación en la última década. Ya en 1952, el Prof. Jimenez Díaz predijo la importancia de la pared vascular en el control de la presión arterial mediante experimentos en animales en los que se lograba un aumento de la presión arterial mediante la circulación cruzada, sin influencia de la vasopresina o el sistema nervioso simpático (1). En 1976, S. Moncada describió la presencia de prostaciclina en la pared vascular (2), y en 1980 Furchgott y Zawadzki (3) comunicaron el hecho de que la vasodilatación mediada por acetilcolina dependía de la integridad del endotelio. De éstas dos observaciones iniciales se siguieron múltiples investigaciones sobre el papel del endotelio como modulador del tono del músculo liso vascular, y su respuesta a agentes farmacológicos, estímulos fisiológicos y en situaciones patológicas (4,5).

B.1. Factores vasodilatadores producidos por el endotelio.

La capacidad vasodilatadora de la acetilcolina (ACh) depende de la integridad del endotelio vascular (2). Esta relación sistema nervioso-endotelio, hoy se considera mediada por un grupo de sustancias con capacidad para activar la enzima guanilatociclasa y acumular GMP cíclico; ésta acumulación inhibe el el proceso contráctil del músculo liso vascular e induce a la relajación (6). Estos factores, inicialmente conocidos como factores relajantes derivados del endotelio (EDRF), finalmente se consideraron con idénticas propiedades farmacológicas al óxido nítrico (NO) (7). Este mediador se sintetiza en el endotelio, y es capaz de inducir acúmulo de GMP cíclico en la musculatura lisa vascular y en las plaquetas (8); su capacidad vasodilatadora es de corta duración, estando su catabolismo inducido por la enzima superóxido dismutasa, lo que indicaría que es inactivada por aniones superóxido (O_2^-) (9); su acción se ve bloqueada por proteínas que poseen el núcleo heme (que se unen al NO con gran afinidad), o el azul de metileno (inhibidor de la enzima guanilato ciclasa). El NO es producido a partir de L-arginina, mediante el paso por NO_2^- y NO_3^- , cuya producción implica NADPH y calcio (10). El papel del NO como vasodilatador endógeno ha sido establecido en experimentos en los que se ha utilizado n-monometil l-arginina (1-NMMA), un inhibidor de la producción de NO mediante el bloqueo de la de NO_2^- y NO_3^- (11). La administración de 1-NMMA incrementa la presión de perfusión coronaria e inhibe la disminución de la presión de perfusión inducida por ACh en estudios en corazón animal aislado (12), así como inhibe la producción de NO. Igualmente, la perfusión de 1-NMMA eleva la presión arterial e inhibe el efecto vasodilatador de la ACh (13). A nivel de la

microcirculación, el bloqueo de la producción de NO reduce la conductancia en los territorios vasculares del riñón, área mesentérica, carótida interna, y extremidades en un 60% (14).

Existe una producción constante de NO por parte de las arterias, lo cual influye en su tono basal, mientras que la producción en el territorio venoso depende de la presencia de estímulos para su formación (15); se ha querido implicar con éste mecanismo el menor índice de estenosis en injertos coronarios de arteria mamaria interna con respecto a los de vena safena (16). Los estímulos para la producción de NO son abundantes y, aunque no se ha esclarecido de forma definitiva, se considera que la presencia de vasoconstrictores (angiotensina, endotelina), o el estímulo nervioso simpático (noradrenalina), son los principales factores para su producción (9). La vasodilatación inducida por el aumento del flujo sanguíneo, se considera mediada por la producción de NO (17); los estímulos mecánicos, por tanto, como el flujo pulsátil o la presión del flujo sanguíneo sobre la pared vascular, son elementos determinantes en la producción de NO (18).

B.2. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio. Endotelina

Las células endoteliales son capaces de producir contracción del músculo liso vascular adyacente. En 1985, Rubanyi y Vanhoutte (19), demostraron que la hipoxia originaba la producción de una sustancia vasoconstrictora, cuya actividad no se modificada por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Hasta la fecha, son 3 los agentes conocidos secretados por el endotelio con capacidad vasoconstrictora (20). Uno de ellos se produce en relación con el aumento de la presión intravascular, el rozamiento, la hiperpotasemia, el ionóforo de calcio A23187 y el ácido araquidónico (21); se cree similar al tromboxano A₂ (17) o a otro derivado del metabolismo del ácido araquidónico, como un leucotrieno (22). No se ha establecido el papel de éste agente vasoconstrictor ni su significado fisiológico o en situaciones de enfermedad.

Otro de los factores secretados por el endotelio juega un papel determinante en la regulación del tono vascular en condiciones de hipoxia (23); se considera relacionado con el anión superóxido o alguna especie similar de radicales libres. El anión superóxido provoca contracciones de la arteria basilar canina, siendo éstas de corta duración e inhibidas por la enzima superóxido dismutasa (23).

El tercer factor contráctil fue descubierto en 1988 en el sobrenadante del medio de cultivo de células del endotelio vascular de aorta porcina, por parte de Yanagisawa et al. (24), del grupo del Prof. Masaki de la Universidad de Tsukuba, en Japón, quienes le aplicaron el nombre de endotelina (ET). Hasta la fecha es la sustancia vasoconstrictora mas potente conocida, con una potencia 10 veces

superior a la de la angiotensina 2. Su efecto contractil, a diferencia del inducido por la hipoxia, es de comienzo gradual, y su efecto sostenido y difícil de revertir (25). Se trata de una proteína de 21 Aa con 2 puentes disulfuro en su interior (figura 1). Del análisis genético (mRNA de ET) (26) se predijo la existencia de tres subtipos de endotelina: ET-1 (inicialmente identificada en el cerdo, con estructura similar a la ET-1 humana), ET-2, con diferencias en 2 Aa, y ET-3, con 6 Aa diferentes a la ET-1, inicialmente considerada como la ET de la rata. La ET-1 es la única ET producida en el endotelio vascular, cuya acción fisiológica parece superior en importancia a la ET-2, con mayor capacidad vasoconstrictora, descrita fundamentalmente como de origen renal (27); la ET-3 parece ligada al tejido nervioso (28). Existen diferencias farmacológicas en cuanto a su capacidad vasoconstrictora (29); la ET-2 posee mayor capacidad vasoconstrictora, seguida de la ET-1 y ET-3. Se han identificado distintos subtipos de receptores para cada una de las formas de ET (30).

Existen similitudes entre la familia de las ET y un grupo de sustancias encontrada en el veneno de algunas serpientes, las sarafotoxinas (31), en concreto, la sarafotoxina 6B (32). Comparten una estructura química similar, diferenciada en 7 Aa y una capacidad vasoconstrictora potente y sostenida (33). La relación de ambos péptidos en la escala evolutiva animal se ve apoyada por el hecho de que posiblemente pertenezcan a la misma familia genética (32), aunque el mRNA de la sarafotoxina 6B sólo ha sido identificada en las glándulas exocrinas productoras del veneno de la serpiente (22), sin relación alguna con el endotelio vascular.

El polipéptido vasoconstrictor intestinal (VIC) posee similitud estructural con respecto a la ET-1, de la que se diferencia tan sólo en 3 Aa (470). Sus acciones biológicas son similares a las de ET-1 (471), aunque posee una mayor capacidad para inducir contracción intestinal y comparativamente es menos potente para provocar vasoconstricción de segmentos arteriales que la ET-1 (472).

La secreción de ET-1 está codificada en el ser humano en el cromosoma 6 (24,34). Deriva de un precursor peptídico de 203 Aa (preproendotelina), que es fragmentado en el interior de la célula endotelial poco después de la translación (24). Esto origina una proteína de 39 Aa llamada ET grande o Big-ET (35). Esta a su vez es convertida a ET-1 mediante una enzima conversora de endotelina (ECE) (36,37), con la producción de un fragmento carboxi-terminal medible, considerado similar a la producción de insulina y péptido C (38,39). Se ha demostrado capacidad vasoconstrictora de la Big ET-1 (40), que sin embargo es mucho menor que el de la ET-1 (41). La importancia de la ECE en la formación de la ET-1 es por tanto fundamental para la expresión de su máxima potencia vasoconstrictora. Se ha identificado la ECE en la membrana celular y el citosol de las células endoteliales (42), con una actividad de proteasa neutra similar a la de la catepsina D (43-45).

La ET fue descrita inicialmente como un producto solo de las células endoteliales (24). En estudios realizados con ET marcada con ^{125}I , se aprecia que los lugares con máxima afinidad se encuentran localizados en el pulmón, hígado y el riñón (46). Mediante análisis de hibridización del DNA, se ha comprobado expresión genética del DNA de ET en el riñón, ojos, pulmón, y cerebelo (47). Las células endoteliales

de aorta y glomerulos renales expresan mRNA de ET (48). Se han identificado receptores de ET en células del músculo liso vascular (MLV) (49), adrenales (50), glomérulos, papila y asas vasculares renales (48), células miocárdicas (51), placenta humana (52), útero (53), arterias coronarias, vasos pulmonares, músculo liso bronquial y nervios periféricos (54), y osteoblastos (55). Igualmente, en los ganglios basales y tronco cerebral (56), y células de la médula espinal (57). Esta extensa difusión de receptores sugiere que la ET juega un papel determinante en la regulación del tono del músculo liso vascular (58,59). Se ha comprobado que los macrófagos son capaces de producir ET (60); junto con su capacidad para estimular la síntesis de DNA en las células de MLV (61) y fibroblastos (62), y actuar como factor de crecimiento de células tumorales en cultivo (63), se ha sugerido que la ET ejerce un papel de regulador local de determinados ambientes biológicos, o mediador químico de funciones aún mas complejas que el puro control del tono vascular (64)

B.2.a. Control de la secreción de ET.

La presencia de RNA mensajero codificado para la preproendotelina en el interior de las células endoteliales ofrece evidencia suficiente para confirmar la capacidad del endotelio para generar ET (24). Se ha comprobado ampliamente la capacidad del endotelio cultivado de generar ET, en diferentes especies, como cerdos, ratas, y humanos (65).

El mecanismo exacto de la producción de ET permanece aún sin aclarar. La figura 2 ofrece un esquema de los mediadores implicados en su secreción.

El análisis ultraestructural con el uso del microscopio electrónico demuestra que las células endoteliales no poseen un número importante de gránulos secretorios (66), lo que sugiere que la ET se genera de novo en función de la presencia de estímulos. Los extractos de células endoteliales que secretan péptidos vasomotores, poseen escasa capacidad vasoconstrictora (67), lo que apoya la idea de que existe poca acumulación de péptidos preformados. Se cree que el control de la secreción de ET está controlado a nivel de la transcripción del RNA mensajero de la preproET (24).

La producción de ET puede estimularse por adrenalina, angiotensina II, vasopresina, factor de crecimiento beta (68), trombina (69) y el ionóforo de calcio A23187 (24). La administración de endotoxina, tanto in vivo como in vitro, estimula la secreción de ET (70). En las células endoteliales en cultivo, sometidas a un incremento mantenido de la presión, se puede apreciar un aumento de la cantidad de mRNA de preproET y de ET (71,72). Se ha descrito que la hipoxia es capaz de estimular la secreción de ET (73), aunque en la vasoconstricción

mediada por la hipoxia es posible que contribuyan otros péptidos no relacionados con la ET (23) por la corta duración de su efecto. Recientemente se ha descrito que factores endógenos similares al digital (ODC1 y ODC2), con capacidad natriurética e inotrópica positiva, estimulan igualmente la secreción de ET (74). En este campo es necesaria una mayor investigación.

B.2.b. Mecanismo de acción de la ET.

Tras su secreción la ET se fija a receptores específicos de alta afinidad -ET_a- (75). Estos receptores se diferencian de otros de baja afinidad -ET_b-, que comparten las tres formas de ET y las sarafotoxinas (76-80), y que en general están relacionados con un efecto vasorelajante transitorio (81). La unión con los receptores ET_a activa la fosfolipasa C para generar inositol trifosfato y diacilglicerol (82-85), que a su vez estimula la liberación de calcio del compartimento intracelular y el influjo de calcio al interior de la célula (85-88); éste mecanismo implica la apertura de canales de cloro (89), con la consiguiente depolarización de la membrana celular, y la activación de los canales del calcio dependientes de voltaje (90,91). La acumulación de diacilglicerol activa la proteína quinasa C y ésta a su vez, la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina para iniciar la contracción de la fibra muscular lisa (92-95).

Se ha comprobado que tras la unión de la ET a sus receptores específicos se estimula la fosfolipasa A₂ para la generación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de la membrana (473); la ET estimula igualmente el intercambio Na⁺/H⁺, con alcalinización del espacio intracelular (474). Ambos mecanismos, junto con la apertura de canales de calcio dependientes del receptor de ET (475), probablemente influyan en el mecanismo de acción de ET, que se representa esquemáticamente en la figura 3.

La degradación de la ET se relaciona con la actividad de la endopeptidasa neutra, una enzima involucrada en la degradación de otras sustancias peptídicas (463). La endopeptidasa neutra NEP EC.3.4.24.11

es una enzima de membrana que se encuentra distribuida extensamente en el riñón, pulmón, cerebro, células endoteliales, tiroides, intestino, neutrófilos y otros tejidos; se ha comprobado que ejerce una clara acción de endotelinasa, especialmente en el riñón y territorio pulmonar (464).

B.2.c. Efectos biológicos de la Endotelina.

Aunque se cree que el papel mas importante de la ET es como mediador local intercelular (64), existe evidencia en la actualidad para sugerir que la ET podría intervenir como hormona circulante involucrada en el tono vascular (96,97). Los niveles plasmáticos de ET en sujetos normales oscilan entre 0,26-5 pg/ml (98-100). En nuestro laboratorio el valor de ET en sujetos sanos es de $0,54 \pm 0,1$ pg/ml. Los RIA mas perfeccionados son capaces de medir valores inferiores a 0,1 pg/ml (101); en éstos, el determinante antigénico utilizado es la región carboxi-terminal de la molécula de ET, que es la esencial para la acción del péptido (102). Se ha comprobado que los niveles plasmáticos de ET encontrados en situaciones fisiopatológicas ejercen acción biológica (97), y que intervienen en la regulación de las funciones cardiovascular y endocrina. Cuando los niveles plasmáticos de ET oscilan alrededor de 12 pg/ml, cifra similar a la encontrada en diferentes patologías (103), predominan los efectos cardiovasculares, en concreto disminución de la frecuencia y gasto cardiacos, y vasoconstricción sistémica, preferentemente renal. Aplicada en animales a dosis farmacológicas (50 ng/Kg/min)(104), se observa una elevación sostenida de la presión arterial y un aumento en las resistencias coronarias, junto con disminución del gasto cardiaco; el flujo plasmático renal y el filtrado glomerular se ven marcadamente reducidos, con una marcada disminución en la excrección fraccional de sodio y una elevación de la actividad de renina plasmática, aldosterona, vasopresina y ANF. La interrelación con factores vasodilatadores, en especial ANF y NO (465,466), determina la intensi-

dad de su efecto; la complejidad de éstas relaciones es aún mas marcada probablemente a nivel de la circulación local (22,64), donde se considera que la ET ejerce su mayor papel vasoconstrictor. La ET ejerce una acción importante como agonista de otros agentes vasoconstrictores (477,478).

B.2.d. Acciones cardiovasculares.

La ET es el vasoconstrictor mas potente conocido (24), y su administración a segmentos vasculares in vitro, tanto en humanos como en animales, provoca una intensa y prolongada vasoconstricción (105-108). La acción de la ET es mas potente en venas que en arterias; las venas de forma característica se contraen con menos dosis de ET que las arterias (109,110). La dosis mínima capaz de originar contracción de segmentos vasculares oscila entre 10 pM a 10 nM de ET-1 (111). Existe una relación inversa entre el calibre del vaso y la máxima contracción originada por ET (112), lo que apoya el efecto vasoconstrictor de ésta preferentemente sobre la microcirculación. Entre los tipos de ET, La ET2 es la mas potente en cuanto a capacidad contráctil, seguida de la ET1 y la ET3 (26). La presencia de endotelio es imprescindible para modular la acción de ET (113): en segmentos vasculares con endotelio íntegro, se reduce la acción contráctil de la ET en comparación con aquellos con endotelio denudado, en los que la contracción es máxima (114-116).

La acción vasoconstrictora de la ET se ha demostrado a nivel de la microcirculación coronaria (117), renal (118), mesentérica (119,120), cerebral (121-123), ocular (124) y cutánea (125,126). Diferentes lechos vasculares muestran una especial sensibilidad a la acción de la ET, según se aprecia por los diferentes cambios en la resistencia tras la administración de ET; el área renal es el mas sensible a la acción de la ET (127), con marcada reducción del flujo plasmático renal que se mantiene de forma prolongada tras su infusión. En la circulación coronaria, la ET provoca un marcado incremento dosis-dependiente de la

resistencia, aunque el flujo sanguíneo coronario se mantiene en las dosis que reducen el flujo renal (127). En el territorio vascular mesentérico y el de las extremidades inferiores se aprecia un marcado efecto contráctil, precedido con frecuencia de una fase vasodilatadora (128); ésta fase inicial asociada a disminución de las resistencias vasculares periféricas se aprecia igualmente en las arterias femorales y bronquiales (107), y es especialmente marcada en gatos, en los que la administración de ET en bolus origina disminución de las resistencias vasculares periféricas (129). Estas diferencias entre áreas vasculares y especies, probablemente se explique por diferencias entre el número de receptores y su afinidad, o por la coexistente presencia de factores relajantes vasculares que antagonizan la acción de la ET (130).

Se ha demostrado una especial sensibilidad genética a la acción de ET; los segmentos arteriales en cultivo de ratas genéticamente hipertensas (ratas Wistar Kyoto) responden de forma excepcional a la adición de ET al medio (131). En éste sentido, cabe destacar que la inhibición de la enzima convertidora de ET con fosforamidón, es capaz de disminuir la presión arterial en éste tipo de ratas (132), lo que apoyaría el papel de la ET como agente involucrado en la patogenia de la hipertensión arterial esencial (22).

La administración en voluntarios humanos de ET a dosis tan bajas como 10 pmol a 10 nmol/min en la arteria braquial provoca disminución marcada del flujo sanguíneo del antebrazo, dosis-dependiente (133). La inyección intradérmica de 1-100 pmol de ET-1 en el antebrazo origina intensa vasoconstricción en el lugar de la inyección, que se mantiene durante mas de 24 horas, así como un halo de vasodilatación a su alrededor, probablemente debida a un reflejo axonal (126).

La administración intravenosa de ET en bolus o en perfusión continua

produce de forma característica elevación de la presión arterial (134); la primera fase de su acción es de vasodilatación, de corta duración, seguida de otra, prolongada, de marcada vasoconstricción (104,127,128,135). Esa primera fase se considera relacionada con la liberación por parte del endotelio de factores vasodilatadores como NO, ANF y prostaciclina (136). El efecto vasoconstrictor observado tras la administración de ET es dosis-dependiente, con pico máximo a los 45 minutos (104). La elevación de la presión arterial es debida a vasoconstricción, que origina aumento de las resistencias vasculares periféricas (127,135). El efecto hipertensivo de la ET se mantiene durante mas de una hora tras la administración de una dosis única en bolus (26), y se asocia a disminución del gasto cardiaco y bradicardia, junto con incremento de la presión en la aurícula izquierda, sin modificarse la presión en la aurícula derecha (127,128,135). El bloqueo ganglionar atenúa el descenso del gasto cardiaco y la bradicardia (134), por lo que se cree que los efectos cardiacos de la ET están mediados en parte a través de vías reflejas autonómicas que responden al incremento de las resistencias vasculares periféricas (137). Se ha descrito, sin embargo, que la ET es capaz de modular la actividad de los barorreceptores (138), lo que reforzaría la acción local del péptido, produciendo vasodilatación a dosis bajas y vasoconstricción a dosis altas. Es posible, en todo caso, que la ET ejerza un papel directo sobre la capacidad contráctil de las células miocárdicas, ya que in vitro provoca efectos inotrópicos (139,140) y cronotrópicos (141) positivos. La ET provoca un mayor efecto inotrópico sobre las aurículas que sobre los ventrículos (142), contribuyendo quizá en la intensidad de la sístole auricular.

B.2.e. Acciones pulmonares.

Las células endoteliales de la macro y microvasculatura pulmonar producen ET1 y ET3 (143), así como el epitelio respiratorio bronquial (144,145). Existen múltiples zonas de captación de ET marcada, que se distribuyen de forma homogénea por ambos pulmones (53). Se ha sugerido que el pulmón ejerce funciones de aclaramiento plasmático de endotelina (146-148), al apreciarse que más del 50% de la dosis de ET administrada a animales de laboratorio es extraída en su primer paso por el pulmón. La vasculatura pulmonar es altamente sensible a la acción vasoconstrictora de la ET-1 (149-150), así como a la de ET-2 y ET-3 (151). El mecanismo de producción de vasoconstricción y edema pulmonar reside en su capacidad para contraer venas pulmonares, mediante la generación de tromboxano A₂ (152). En condiciones de hipoxia, se produce vasoconstricción pulmonar sólo en el caso de encontrarse íntegro el endotelio (153), mecanismo que es capaz de ser bloqueado mediante antagonistas del calcio (154). Se han descrito niveles plasmáticos elevados en pacientes con hipertensión pulmonar primaria; la similitud de los hallazgos hemodinámicos e histológicos apreciados en ésta enfermedad y los observados tras la administración de ET, han hecho considerar a la ET como un mecanismo patogénico primordial en la hipertensión pulmonar (155). En éste síndrome se ha descrito por otra parte marcada disfunción endotelial (456), con secreción reducida de prostaciclina y óxido nítrico (457,458).

La ET es capaz de producir broncoconstricción, tanto in vivo como in vitro (156-158), habiéndose descrito aumento de los niveles plasmáticos de ET en pacientes asmáticos (159), concentraciones elevadas de ET en

el lavado bronquioalveolar en pacientes en el seno de graves crisis de asma (160), y aumento de la inmunoreactividad de ET en biopsias pulmonares de éstos pacientes (161). Igualmente, la ET es capaz de estimular la actividad de la 15-lipooxigenasa (162), incrementando la síntesis del ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico, que posee una fuerte capacidad quimiotáctica para los leucocitos, especialmente eosinófilos. Todos éstos datos inducen a pensar que la ET juega un papel relevante en el mecanismo de vasoconstricción pulmonar, y de broncoconstricción en situaciones patológicas.

B.2.f. Acciones renales.

La ET incrementa de forma notable la resistencia vascular renal (104,106,128), siendo éste área vascular diez veces mas sensible a la acción vasoconstrictora de la ET que otros territorios (163). Los estudios autorradiográficos han mostrado una alta densidad de receptores de ET en la arteria y vena renales, arteria arcuata, interlobular, ovillo vascular, glomérulo y papila renal (164). Se ha detectado mRNA de ET en regiones corticales y medulares renales (165). El efecto fundamental de la administración de ET, sobre el riñón, es el incremento en la resistencia vascular, disminución del flujo sanguíneo renal, y disminución del filtrado glomerular (104,166-168). Este último efecto está influido igualmente por la capacidad de la ET para contraer células mesangiales (169), produciendo vasoconstricción capilar glomerular y descenso del coeficiente de ultrafiltración (170-171). La ET induce igualmente reducción en el volumen urinario y en la excrección fraccional de sodio y litio, en relación con su capacidad de aumentar la reabsorción de sodio y agua desde el túbulo proximal (172). La acción de la ET sobre el riñón es típicamente antinatriurética, dosis dependiente, de efecto sostenido en el tiempo, y difícilmente reversible (104), aunque es atenuada parcialmente con ANF (173), nitroglicerina (174), y verapamil (175).

La ET in vitro inhibe la secreción de renina (176-178); sin embargo, tras la administración de ET a animales de laboratorio se aprecia un aumento en la actividad de renina plasmática (104,127). Es posible que la ET influya sobre ésta mediante diferentes mecanismos, tanto directamente como indirectamente a través del cambio en la

concentración de sodio en la mácula densa, o por medio de la variación en la presión arterial glomerular (137).

Se han descrito niveles plasmáticos elevados de ET en la insuficiencia renal aguda (179), considerándose un factor relevante en la génesis de la insuficiencia renal prerrenal (180). Es posible que la ET esté involucrada de forma importante en la génesis de la insuficiencia renal postisquémica, al haberse comprobado que los anticuerpos anti-ET son capaces de mejorar el filtrado glomerular y el flujo plasmático renal en un modelo experimental de lesión renal isquémica (118).

Se ha implicado a la ET como agente mediador de la toxicidad renal de la ciclosporina A (CyA), pues la CyA aumenta los niveles plasmáticos de ET (181), estimula su producción in vitro (182), y la infusión de anticuerpos neutralizantes anti-ET previene del daño glomerular y la proliferación del músculo liso vascular asociado al tratamiento con CyA (183). La CyA, por otra parte, es capaz de lesionar las células endoteliales mantenidas en cultivo, produciendo lisis y despegamiento celular (449). Se ha sugerido un papel importante de la ET en el rechazo vascular del trasplante renal en pacientes tratados con CyA (450), aunque no se es posible relacionar por completo los niveles de ET con la HTA que se aprecia con una frecuencia en pacientes transplantados cardiacos tratados con CyA (451).

Se han descrito niveles elevados de endotelina urinaria en casos de nefrotoxicidad inducida por cisplatino (184).

Se ha sugerido que la ET juega un papel relevante en la glomerulonefritis (185), pues la administración de agentes proinflamatorios en el glomérulo renal, como análogos del tromboxano A₂ o factor transformador del crecimiento beta (TGF- β), estimulan la síntesis de mRNA de ET y la secrección del péptido (186).

B.2.g. Acciones endocrinológicas.

Se considera que la ET ejerce funciones predominantemente como hormona de la microcirculación, sintetizada por células específicas endoteliales o epiteliales, y actuando de forma autocrina o paracrina en células diana adyacentes. El hecho de su corta vida media y su aclaramiento en un primer paso por el pulmón son hechos que lo apoyan (187). Sin embargo, es posible que en determinadas circunstancias, la ET se libere a la circulación y actúe como clásica hormona circulante.

Aunque su principal acción sea su capacidad vasoconstrictora, la ET ejerce efectos indirectos a través de interacciones con diversos sistemas endocrinos. La infusión de ET en animales produce un rápido aumento en los niveles de ANF, renina, aldosterona, y catecolaminas circulantes (104,127). Existe una relación inversa entre ET y ANF, actuando ésta como contraregulador de la acción presora de la ET (188,189). Existen áreas de captación de ET marcada en las glándulas suprarrenales (190), y el hallazgo de zonas de alta densidad en las zonas glomerulosa y en la médula (50), sugiere la posibilidad de que la ET modula en parte la biosíntesis de aldosterona y catecolaminas (50). Células de la zona glomerulosa suprarrenal en cultivo incrementan la síntesis de aldosterona en presencia de ET (191). La angiotensina II modula la acción presora de la ET mediante una disminución del número de sus receptores (192); sin embargo, la AG II estimula la secreción de ET y por tanto aumenta la contractilidad de las arterias de ratas espontáneamente hipertensas (467). Igualmente, células adrenales cromafines en cultivo incrementan la síntesis de epinefrina y norepinefrina tras la adición de ET (193). Se ha comprobado que tras

incubación con dosis bajas de ET, se incrementa el efecto presor de la norepinefrina sobre arterias mesentéricas en cultivo (194), considerándose que la ET es capaz de modular la transmisión nerviosa simpática mesentérica (195). Ya se ha descrito el efecto inhibitor in vitro (176), estimulador in vivo (104), sobre la actividad de renina plasmática. Es posible, por tanto, que la acción de la ET sobre otros sistemas de mantenimiento de la presión arterial sea directo, y no influido por los efectos hemodinámicos de la ET, ya que ésta ejerce un efecto presor, lo que al menos teóricamente disminuiría la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Se ha descrito una acción estimulante de la ET sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, en el contexto del posible papel como neuropéptido de la ET, especialmente ET-3. La administración intravenosa de ET-3 origina un aumento de ACTH y corticosterona similar al producido por CRH, que se bloquea mediante antagonistas de CRH (196). Igualmente, es capaz de estimular la secreción de GnRH hipotalámica (hormona liberadora de gonadotropinas), y gonadotropinas hipofisarias (197). La ET-3 es capaz de inhibir la secreción de prolactina de células de la hipófisis anterior en cultivo, sin modificar la de hormona de crecimiento (GH), estimulante del tiroides (TSH), o luteinizante (LH) (198). Se ha demostrado mRNA de ET e inmunoreactividad para ET en neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular, que se atenuaba significativamente en condiciones de privación de agua (199); ésto sugiere que la ET ejerce funciones reguladoras sobre las hormonas de la neurohipófisis, la oxitocina y la vasopresina, aunque los mecanismos de control estén aún descritos de forma incompleta.

B.2.h. Acciones neurológicas.

Las acciones de la ET sobre el sistema nervioso pueden considerarse desde el punto de vista vascular, o sea, la capacidad de la ET de contraer arterias y venas del sistema nervioso, y desde el punto de vista de la neurotransmisión, ya que se considera que la ET, especialmente la ET3, ejerce funciones como neuromodulador.

Existen abundantes zonas de captación de ET de alta afinidad en el sistema nervioso, especialmente en el hipotálamo, corteza cerebral, hipocampo, medula oblonga, y médula espinal (57,200-204), y se ha demostrado inmunoreactividad de ET-1 en el líquido cefalorraquídeo humano (LCR) (205). Se ha comprobado un efecto vasoconstrictor de la ET sobre arterias cerebrales, de larga duración, por un mecanismo calcio-dependiente (206,207), que se puede atenuar con verapamil (208). El efecto contractil inducido por ET es tanto endotelio-dependiente, como independiente, probablemente mediado por tromboxano A₂ (209). El efecto vasoconstrictor es más potente sobre arterias de la piamadre que sobre venas, y sobre ramas de la arteria meníngea media y temporal superficial (210). Se han demostrado efectos sobre la microcirculación cortical cerebral tras la administración de ET-1 a través de la arteria carótida interna. A dosis altas es capaz de producir vasoconstricción cortical, junto con elevación de la presión arterial y las resistencias vasculares (211); las inyecciones intracorticales de ET inducen prolongadas reducciones de del flujo cortical, sin modificar la presión arterial (211). Se ha comprobado una disminución en el flujo sanguíneo a los plexos coroideos tras la administración intravenosa de ET, sin modificar el flujo cerebral (212), lo que sugiere un papel de la ET

sobre la producción de LCR.

En otros estudios se ha demostrado un escaso efecto sobre el tono de la arteria basilar tras la administración de ET a través de la arteria vertebral, a diferencia del efecto contráctil obtenido tras la administración de ET intracisternal (213), lo que induce a pensar que la ET actúa en el sistema nervioso a través del lado adventicial pero no intraluminal; estudios con ET marcada administrada por vía intravenosa no han demostrado captación en el sistema nervioso central, excepto en áreas con ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) (214). El elevado peso molecular de la ET (2491,9 daltons), probablemente impida circular libremente a la ET a través del endotelio y la BHE (26).

El papel de la ET como neuropéptido está basado en la demostración de mRNA de ET en regiones del sistema nervioso (215) y en la capacidad de depolarizar células neuronales en cultivo (216). La administración intratecal de ET induce cambios importantes en el comportamiento de los animales, que adoptan una compleja actitud de "barrel-rolling" (217,218). Ya se ha comentado la capacidad moduladora de la ET en la secreción de ACTH, FSH, LH, y prolactina (197), y su influencia en la secreción de oxitocina y vasopresina (199, 219). Se han apreciado niveles elevados de ET en LCR de pacientes con depresión mayor (220). Es posible que la ET influya en el control central de la tensión arterial; se ha demostrado que la administración intratecal de ET a dosis altas, eleva la presión arterial, la frecuencia cardíaca y los niveles plasmáticos de catecolaminas (221); éste efecto esté quizás mediado por la isquemia, ya que, en otros estudios, la administración intracisternal de ET en dosis en rango picomolar, produce vasodilatación periférica y descenso de la presión arterial (222).

Aunque la capacidad presora de la ET-1 es superior a la de ET-3 en vasos periféricos, posee similar potencia en cuanto al control de la presión arterial administrada por vía intratecal (222).

Se ha involucrado a la ET como agente mediador del vasoespasmo tras la hemorragia subaracnoidea (HSA) (223,224), al comprobar marcado vasoespasmo en la arterografía de animales a los que se había administrado ET por vía intravenosa o intracisternal (206). Se han comprobado hallazgos histológicos similares en autopsias de pacientes con HSA y vasoespasmo (225), y en animales sometidos a administración continua de ET intracisternal (226). La respuesta vasoconstrictora a la ET es superior en segmentos arteriales de ratas sometidas a HSA frente a controles (227). Se han demostrado niveles plasmáticos elevados de ET1 (228) en pacientes con HSA y vasoespasmo. Aunque éstos hallazgos no se han confirmado en otras series de pacientes (229), es posible que la ET, junto con otros péptidos de carácter vasoconstrictor, como la serotonina, prostaglandinas o catecolaminas, se encuentre involucrada en las alteraciones vasomotoras que siguen a la HSA.

B.2.i. Otras acciones biológicas de la ET.

Una de las acciones de la ET con importancia muy relevante en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, es su capacidad para estimular el crecimiento celular. Se ha demostrado que la ET posee actividad mitogénica (230); ésto se ha comprobado en células del músculo liso vascular, fibroblastos, células mesangiales glomerulares, y células carcinomatosas humanas (60-62,231-237); esta capacidad mitogénica se relaciona con el estado fenotípico de las células, siendo mayor su efecto en las del músculo liso vascular que muestran un fenotipo contráctil (238). No se conoce con precisión la importancia biológica de la mitogénesis inducida por ET, pero, al igual que otros péptidos reguladores, podría intervenir en la remodelación glomerular asociada a la inflamación, o en otras respuestas adaptativas del endotelio al daño vascular, incluida la hipertensión. La ET incrementa la transcripción de los protooncogenes c-fos y c-myc en el musculo liso vascular (61,235), mecanismos asociados habitualmente a la proliferación celular, y estimula la síntesis de DNA en células endoteliales (239), en fibroblastos (240) y en células miocárdicas (241). Estos hallazgos sugieren que la ET podría desempeñar un papel en el desarrollo de las lesiones tróficas que se aprecian en la arteriosclerosis (242), y quizá en la patogenia de la hipertrofia ventricular izquierda de la hipertensión arterial.

Se ha descrito un efecto lesivo para la mucosa gástrica por parte de la ET, potenciada por indometacina (243-244).

En pacientes con cirrosis hepática se han descrito niveles elevados de ET, especialmente en situaciones de ascitis o insuficiencia renal

funcional (452,453), aunque otros autores han apreciado niveles normales (263), o incluso bajos con respecto a controles sanos (454). Es muy probable que la ET ejerza un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión portal, ascitis e insuficiencia renal funcional, ya que otros agentes vasodilatadores de efecto antagónico a la ET, como el NO o prostaciclina, influyen notablemente en la vasodilatación esplácnica que de manera constante se aprecia en estadios avanzados de la enfermedad (284). Recientemente se han descrito niveles plasmáticos elevados de ET-1 y ET-3 en pacientes con cirrosis con síndrome hepatorenal (479), involucrando a la ET como agente mediador del fracaso renal de la cirrosis hepática (480).

En pacientes con esclerosis sistémica se han reportado niveles plasmáticos elevados de ET (245), así como en pacientes con síndrome de Raynaud (246,247), y tras exposición al frío (248,249). En pacientes con vasculitis sistémica del tipo enf. de Takayasu o enf. de Buerger, los niveles plasmáticos de ET se encuentran elevados (250).

Se han descrito igualmente niveles plasmáticos elevados de ET durante la sepsis y la coagulación intravascular diseminada (251-252), y durante procedimientos quirúrgicos mayores (253).

Se han encontrado niveles plasmáticos elevados de ET en pacientes con diabetes mellitus (254,342,343); el elevado interés de éste hallazgo se confirma por hallazgos de laboratorio en los que se ha comprobado una alteración en los mecanismos de relajación en segmentos vasculares de pacientes diabéticos (59), o artificialmente sometidos a ambientes de cultivo hiperglucémicos (255,256). Otros estudios, sin embargo, no han confirmado la presencia de niveles plasmáticos elevados de ET en pacientes diabéticos (344,345), atribuyendo a defectos metodológicos

las descripciones iniciales; los modelos animales de diabetes mellitus ofrecen igualmente notable variabilidad con respecto a los niveles de ET (462). Resulta en todo caso tentador especular con respecto al posible papel de la ET en la génesis de complicaciones asociadas a la diabetes, tales como enfermedad vascular, HTA o nefropatía.

B.2.j. Situaciones clínicas con posible implicación de la Endotelina.

1. Hipertensión arterial.

Schichiri et al. (257) han descrito niveles plasmáticos elevados de ET en pacientes con HTA esencial. Kohno et al. (258), confirmaron éstos hallazgos en 12 pacientes con HTA esencial, apreciando una correlación lineal entre la TA media y los niveles de creatinina plasmática, e inversa con el filtrado glomerular. Saito et al. (259) describieron niveles plasmáticos de ET-1 significativamente elevados con respecto a controles en pacientes con HTA esencial, apreciándose una correlación con el mayor grado de afectación vascular sistémica de la HTA, expresado en grados de la OMS. Los estudios de nuestro propio grupo confirman éstos datos (476). Sin embargo, otros estudios no han conseguido apreciar éstos resultados; Davenport et al., estudiaron 25 pacientes con HTA esencial sin afectación vascular ni lesión en órganos diana, tras desarrollar un RIA para ET sensible y específico, sin apreciar diferencias con respecto a controles sanos (260). Miyauchi et al. (261) no encontraron diferencias significativas entre los valores de ET entre controles sanos y una población de 42 hipertensos límite, sin tratamiento.

Por otra parte, se han reportado niveles plasmáticos elevados de ET en pacientes con HTA inducida por ciclosporina (262), y tras transplante heterotópico de hígado (263); en la actualidad se está trabajando en el papel de la ET en la HTA inducida por eritropoyetina.

Se ha sugerido que la ET podría relacionarse mas con el progreso que con el comienzo de la HTA esencial (259); junto con la reconocida

alteración de los mecanismos de relajación vascular en la HTA esencial (264), y los hallazgos de laboratorio, en los que se confirman niveles altos de ET-1 en animales con HTA maligna (265), se puede afirmar que la ET desarrolla un papel importante en la patogenia o en las complicaciones de la HTA (266). Otro dato que apoya la implicación de la ET en la génesis o mantenimiento de la HTA es el efecto hipotensor del fosforamidón, un inhibidor del paso de pro-endotelina a endotelina, en ratas genéticamente hipertensas (132).

Se han descrito niveles plasmáticos elevados de ET en la pre-eclampsia (439-442), de origen probablemente utero-placentario (443). La pre-eclampsia se caracteriza por hipertensión, proteinuria y activación del sistema de coagulación, una situación clínica que puede explicarse en base a vasoconstricción generalizada junto con disfunción vascular endotelial materna (444); parte de las características clínicas de ésta situación, como la vasoconstricción periférica, de preferencia en la circulación renal, la disminución del flujo arterial uterino gestante, son explicables por la acción de un agente vasoconstrictor como la ET (445); por otra parte, se ha comprobado que el suero de pacientes con pre-eclampsia ejerce un efecto negativo sobre la producción de ET por parte del endotelio vascular (446), lo cual podría indicar que en el suero de las pacientes existe algún factor que podría ser parte de un sistema de respuesta a los niveles elevados de ET. Durante el embarazo se han descrito también niveles elevados de ET sin existencia de hipertensión, especialmente en el primer trimestre y en el momento del parto, así como en el líquido amniótico y en las venas umbilicales (447), lo que sugeriría su papel como hormona circulante durante la gestación y el parto (448).

2. Cardiopatía isquémica.

Stewart et al. han descrito recientemente niveles plasmáticos elevados de ET-1 en 22 pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM)(267); los valores de ET alcanzaron un máximo a las 6 horas del comienzo del dolor, normalizándose a las 24 horas, excepto en pacientes en con secuelas hemodinámicas o isquémicas del infarto. En 10 pacientes con IAM, nosotros pudimos encontrar resultados similares, manteniéndose elevados durante las primeras 24 horas y con influencia notable de la fibrinólisis (aumenta los niveles plasmáticos de ET) (365) (ver protocolo de IAM en ésta misma Tesis Doctoral). Ray et al. (268), apreciaron similares niveles de ET en 11 pacientes con IAM. Yasuda et al. (269), encontraron igualmente niveles altos de ET en 9 pacientes con IAM, que se normalizaban sin embargo a los 14-16 días del comienzo de los síntomas. No está establecida la influencia de la fibrinólisis en los niveles de ET, pero se ha sugerido que es necesaria la reperfusión de la arteria ocluida para la elevación de la ET en modelos experimentales de IAM (270); Watanabe et al. demostraron que el tratamiento con anticuerpos bloqueantes de la ET disminuía la extensión del IAM (271).

El papel de la ET en la angina vasoespástica se ha considerado como muy relevante (272); Toyo-Oka et al (273) reportaron niveles elevados de ET en 12 pacientes con angina variante con espasmo provocable en la arteriografía. Matsuyama et al. (274,438), han descrito niveles altos de ET en 26 pacientes con angina variante que incrementaron los niveles de lactato en seno coronario, tras la administración de acetilcolina intracoronaria; en pacientes sin angina variante y en aquellos que no elevaron los niveles de lactato, no se produjeron diferencias en la

concentración de ET en seno coronario. Es posible que la ET actúe como agente sensibilizador del vaso para facilitar respuestas contráctiles, regulando el tono vascular junto con otros factores como la prostaciclina, ANF, tromboxano, serotonina, catecolaminas, y NO.

No se han confirmado hallazgos preliminares sobre el papel de la ET en la angina inestable o en los pacientes con síntomas estables de angina (275); en nuestro grupo hemos podido encontrar niveles plasmáticos significativamente más elevados que los controles, en 7 pacientes con angina inestable (276). Stewart et al. (277), no encontraron diferencias significativas en pacientes con angina, 17 estable y 5 inestable, con respecto a controles.

La situación clínica de shock cardiogénico es una de las que se asocian con niveles plasmáticos más elevados de ET (278,279); en 14 pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva crónica se han descrito valores altos de ET, junto con ANF y renina (280). En animales en los que se provocó insuficiencia cardiaca mediante arritmia ventricular, se encontraron niveles altos de ET, que se correlacionaron con la presión la aurícula derecha y la presión de enclavamiento pulmonar (281). Aunque no se conoce con precisión el papel de la ET en ésta situación clínica, se puede especular sobre su influencia en situaciones de reducción del volumen circulante efectivo, como en la insuficiencia cardiaca o la deplección de volumen (282). Recientemente se han descrito niveles elevados de ET en la insuficiencia cardiaca congestiva, con valores de ET por encima de aquellos que ejercen acciones biológicas in vivo, por lo que probablemente la ET se encuentre involucrada en el aumento de las resistencias vasculares periféricas de forma similar al sistema renina-angiotensina o la actividad del sistema nervioso simpático (459,460).

3. Insuficiencia renal.

Koyama et al. (179) describieron en 48 pacientes con insuficiencia renal crónica, niveles plasmáticos elevados de ET; eran especialmente altos en 37 pacientes en régimen de hemodialis, reduciéndose significativamente tras la diálisis. Estos hallazgos se han confirmado en otras series (257,283). Aunque la relación entre los niveles de ET y de creatinina no es directa, es posible que la ET se encuentre elevada en la hemodialisis como mecanismo de mantenimiento de la presión arterial, y como consecuencia del daño endotelial y la hipoxia sostenidas en la insuficiencia renal crónica. El marcado efecto presor sobre la circulación renal y la sensibilidad de la acción vasoconstrictora de la ET en el riñón son datos que apoyan su papel en la insuficiencia renal isquémica.

En el síndrome hemolítico urémico se han descrito niveles elevados de ET en la orina, de probable origen renal (455); ésta enfermedad representa probablemente la expresión clínica de la afectación multisistémica relacionada con el daño endotelial.

4. Vasoespasmo tras hemorragia subaracnoidea.

Masoka et al. (228) estudiaron 12 pacientes con HSA, apreciando niveles plasmáticos elevados de ET con respecto a controles; en 7 pacientes con vasoespasmo sintomático, los niveles de ET fueron significativamente superiores que los que no sufrieron vasoespasmo, coincidiendo el pico de ET con la aparición de vasoespasmo en todos los casos. Fujimori et al (229) apreciaron niveles altos de ET a la segunda semana de la aparición de la HSA en 8 pacientes con vasoespasmo. Existe suficiente evidencia de laboratorio como para considerar que la ET está involucrada en la regulación del tono vasomotor de las arterias del SNC (285); el bloqueo de la producción de ET, mediante la anulación farmacológica de la enzima convertidora de big-endotelina, por medio de fosforamidón, es capaz de disminuir la incidencia de vasoespasmo, asociado a la disminución de los niveles de ET en LCR (286).

5. Sepsis.

Desde la descripción de Sugiura et al (70), del papel de la endotoxina en la liberación de ET, se han reportado pruebas de la implicación de la ET en ésta situación clínica. Se ha comprobado que la interleukina-1 incrementa la secreción de ET en células endoteliales en cultivo (287); el papel de la interleukina-1 en la sepsis y el shock séptico está claramente establecido, como mediador y potenciador de la acción del factor de necrosis tumoral (TNF)(288,289). Los leucocitos polimorfonucleares son capaces de secretar ET, convertir big-ET a ET, y degradar ET (290), y al igual que los macrófagos, que sintetizan y secretan ET (58), son células implicadas en la fisiopatología de la sepsis; las relaciones entre el endotelio y las células efectoras del sistema inmune probablemente sean fundamentales a la hora de controlar la migración de las células inflamatorias (291-294), y es posible que la ET juegue un papel en éste sentido (58).

Pittet et al. (295) han descrito niveles plasmáticos aumentados de ET-1 en 11 pacientes en las primeras 24 horas de evolución de síndrome séptico; existía una correlación significativa entre el grado de severidad clínica y los niveles de creatinina plasmática y los valores de ET-1. El grado de depresión miocárdica, expresado por el índice cardiaco, se correlacionaba inversamente con la ET. Igualmente Weitzberg et al (250) encontraron niveles plasmáticos elevados de ET en 6 pacientes con sepsis en diferentes momentos de su evolución, relacionados igualmente con el grado de deterioro de la función renal.

C. Objetivos del proyecto.

La hipótesis de trabajo es comprobar la implicación de la ET en situaciones clínicas asociadas a daño endotelial. En el caso de la isquemia en extremidades, angina inestable, infarto agudo de miocardio, o accidente vascular cerebral, el daño endotelial está directamente relacionado con la isquemia. En el caso del síndrome séptico, la endotoxina y la cascada iniciada a partir de la producción de TNF, son los mediadores del daño endotelial.

La acción de los péptidos reguladores del tono vascular cada día se conoce con mas precisión, y la relación entre agentes vasoconstrictores y vasodilatadores parece en la actualidad de mas importancia que el efecto aislado de alguno de éstos péptidos. La proporción entre NO y ET, ANF y ET, prostaciclina y tromboxano, parece clave a la hora de controlar el tono vascular. El conjunto de sustancias vasoconstrictoras y proagregantes, se ve contrarregulado por la presencia de agentes vasodilatadores y antiagregantes. La tendencia hacia el desequilibrio en uno u otro sentido es lo que determinará finalmente el tono de la fibra muscular lisa adyacente al vaso de la microcirculación (figura 2). Existe evidencia en la Literatura y en nuestro propio grupo sobre el equilibrio entre angiotensina 2 y ANF. En situaciones de daño endotelial agudo, se ha comprobado una menor producción factores vasodilatadores, en especial óxido nítrico y prostaciclina, y existe una evidencia creciente en la Literatura en cuanto a la importancia del aumento en la secreción de endotelina.

En situaciones de daño endotelial agudo, en que el control del tono vascular se altera, la tendencia hacia la producción de ET ó NO, y la

presencia de suficientes mecanismos de compensación, por medio de ANF, prostaglandinas, sistema renina-angiotensina, o sistema nervioso simpático, determinará cual será la situación de la microcirculación. En el caso del infarto de miocardio o la sepsis, ésto influirá en el control de la tensión arterial y en el mantenimiento del gasto cardiaco.

Sin embargo, el tono vascular probablemente solo sea el primer estadio de la influencia del balance entre sustancias vasodilatadoras y constrictoras; está claramente establecido el papel del NO y la ET en la regulación de la tensión arterial a largo plazo, y su influencia en la aparición de complicaciones. Ambos agentes influyen de manera opuesta en el crecimiento celular, y es posible que en la hipertrofia de la musculatura vascular lisa, y quizá en el desarrollo de la placa ateromatosa, ejerzan una influencia determinante (468).

Proponemos en éste trabajo comprobar si en éstas situaciones clínicas en las que existe daño endotelial, se objetivan cambios en la producción de Endotelina, en relación con situaciones fisiológicas de normalidad. La elevación de ET en éstas circunstancias nos permitiría hipotetizar sobre su posible papel como marcador de daño vascular y su participación en la fisiopatología de la enfermedad vascular y la sepsis.

D. Material. Protocolos de estudio.

D.1. Clampaje aórtico infrarrenal.

Se estudiaron 13 pacientes con arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores, durante la realización de un clampaje aórtico infrarrenal para la colocación de una prótesis aorto bifemoral. La edad media de los enfermos fue de 67 ± 17 años. 12 pacientes eran varones. 6 pacientes procedían del Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Universitario san Carlos (HUSC), y 7 de la misma unidad de la Clínica de la Concepción, Fundación Jiménez Díaz (FJD). En los 13 pacientes se había documentado mediante arteriografía, la presencia de obstrucción aórtica por ateromatosis, y en todos los pacientes se recogía una historia de claudicación intermitente en miembros inferiores de más de 6 meses de evolución. En todos los pacientes se documentó la presencia de algún factor de riesgo cardiovascular, siendo los más frecuentes tabaquismo (8 pacientes), diabetes (5), hipertensión arterial (4), hiperlipidemia (3).

El día previo a la intervención quirúrgica, se obtuvieron muestras de sangre venosa con el paciente en reposo y tras un ayuno de más de 8 horas. Se obtuvieron además muestras de vena periférica tras la inducción anestésica, a los 5 minutos del clampaje de la aorta, y a los 5 y 30 minutos de la retirada del clamp aórtico, con la prótesis funcionando. Las muestras se denominaron Basal, Preclampaje, Isquemia, Reperusión precoz y Reperusión tardía, respectivamente. El procedimiento anestésico, y la técnica quirúrgica fueron las convencionales, con laparotomía media y apertura de ambas regiones

inguinales. Las muestras de sangre que se obtuvieron durante el acto quirúrgico procedían siempre de un catéter instalado en la vena femoral, durante la disección de una de las dos áreas inguinales, al comienzo de la cirugía, antes del clampaje aórtico. El tiempo medio de duración de la operación fue de 3,17 horas (2,15-4), y el tiempo de duración de la isquemia inducida por el clampaje aórtico de 37,8 minutos (20-58).

Las muestras de sangre (10 ml), se conservaron en tubos con EDTA, que durante la operación se mantuvieron en el quirófano en un baño de hielo; inmediatamente después de su extracción fueron centrifugadas para la obtención del plasma.

Todas las muestras fueron procesadas en el mismo laboratorio y con el mismo método, independientemente de la procedencia del paciente.

D2. Angioplastia coronaria en pacientes con angina inestable.

Se estudiaron prospectivamente 7 pacientes con angina inestable, cuya sintomatología dependía de una obstrucción única en una sola arteria coronaria, que fueron sometidos a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), para el alivio de los síntomas. Los pacientes estaban ingresados en el HUSC al cargo del Departamento de Exploración Cardiopulmonar.

El diagnóstico de angina inestable se estableció cuando el paciente presentaba síntomas sugestivos de angina, y se podía clasificar dentro de alguna de las tres formas clínicas que definen a ésta entidad clínica (312). 4 pacientes presentaban angina de reposo, 2 pacientes angina de reciente comienzo con síntomas frecuentes (mas de tres episodios de angina diarios), y 1 paciente síntomas de angina acelerada, con clínica presente a menos esfuerzo de lo que solía presentarse. En ningún caso se pudo documentar la presencia de alguna enfermedad extracardiaca que contribuyera a la aparición o aceleración de los síntomas. En ningún caso se documentó elevación de la CPK-MB junto con los síntomas de angina.

Los pacientes fueron seleccionados mediante la revisión del parte diario de ACTP regladas del HUSC. A todos los pacientes que fueron incluidos en el estudio se les había realizado una coronariografía diagnóstica en los días previos, en la que se mostraba una lesión única de un sólo vaso. Los pacientes que cumplían éste requisito fueron evaluados para la inclusión en el estudio y la cumplimentación de los datos del protocolo.

La ACTP se realizó siguiendo la rutina del método. Previamente se procedió a cateterizar el seno coronario (a través de una vena

femoral), que se identificó mediante angiografía. Antes de la angioplastia, se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) del seno coronario, arteria coronaria que iba a ser dilatada, arteria femoral y vena femoral, en éste orden. Entre 3 y 5 minutos después de comprobada que la dilatación había sido eficaz, se volvieron a obtener muestras procedentes del seno coronario, arteria coronaria, arteria femoral y vena femoral, en éste orden. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con EDTA previamente mantenidos en un baño de hielo.

Las historias clínicas de los pacientes volvieron a ser revisadas después de un seguimiento superior a los 14 meses, para comprobar la presencia de reestenosis.

D.3. Infarto agudo de miocardio.

Se estudiaron de forma prospectiva 10 pacientes diagnosticados de infarto agudo de miocardio (IAM), ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos y Coronarios del HUSC. El diagnóstico de IAM se basó en hallazgos electrocardiográficos, clínicos y enzimáticos habituales. Los pacientes fueron incluidos en el estudio si no presentaban insuficiencia cardíaca, aplicándose el tratamiento habitual en el que podría o no estar incluida la fibrinólisis.

Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes que presentaban un tiempo de evolución del dolor inferior a las 12 horas. Se obtuvieron muestras de sangre de una vena periférica en el momento del ingreso, y a las 4, 8 y 24 horas de éste. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con EDTA previamente incluidos en un baño de hielo, y se centrifugaron inmediatamente; las muestras de plasma se congelaron a -70° C hasta su procesamiento para ET, ANF y CRA. Se procedió a la fibrinólisis si estaba indicada, mediante estreptoquinasa o rTPA (activador tisular del plasminógeno recombinante), según las pautas habituales de tratamiento de la UCI del HUSC, siempre dentro de la primera hora del ingreso. La muestra inicial del ingreso del paciente fue siempre previa al comienzo del tratamiento fibrinolítico, y normalmente coincidió con la extracción de sangre para la determinación de enzimas y bioquímica habitual.

D.4. Accidente vascular cerebral isquémico.

Se estudiaron 17 pacientes con accidente cerebrovascular agudo de naturaleza isquémica (ACV), ingresados en los Servicios de Medicina Interna 3 o Neurología del HUSC. El diagnóstico se basó en la demostración de daño neurológico de mas de 24 horas de evolución, comprobándose por tomografía axial computarizada (TAC) craneal, la inexistencia de tumor o hemorragia.

14 pacientes (82.3%) presentaron signos neurológicos dependientes de lesión isquémica en el territorio de la arteria carótida; 3 (17.6%) lo fueron de lesiones dependientes del territorio vertebro-basilar. 5 enfermos (29%) sufrieron probablemente un embolismo cerebral por la presencia simultánea de fibrilación auricular. 3 enfermos (17%), por las características clínicas y radiológicas, fueron diagnosticados de infartos lacunares. 9 pacientes (52%) sufrieron probablemente lesiones trombóticas arteriales in situ. Las características clínicas se resumen en la figura D1.

El estudio se dividió en dos partes: 1. Evaluación de los niveles plasmáticos de ET, CRA y ANF, y valoración del daño neurológico, en el momento del ingreso en el Hospital. 2. Seguimiento clínico y niveles plasmáticos de ET, ANF y CRA a los días 3° y 7°; en un grupo (grupo 1), 8 pacientes recibieron tratamiento con 120 mg/día de nicardipina por vía oral, con el fin de determinar si el tratamiento con antagonistas del calcio modificaba los niveles plasmáticos de ET. En otro grupo (grupo 2), 9 pacientes recibieron tratamiento convencional.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa para ET, ANF y CRA, a todos los pacientes en el momento del ingreso, al tercero y al séptimo días

de su estancia en el Hospital; se obtuvieron igualmente muestras de sangre procedente de la arteria radial al ingreso, y en los días tercero y séptimo, para la determinación de ET arterial. Las muestras se recogieron en tubos con EDTA mantenidos en un baño de hielo, en jeringas que no contenían ningún anticoagulante. El proceso de las muestras para la determinación de ET, ANF y CRA se especifica en la sección de Métodos. Se evaluó el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y la hora de la toma de la primera muestra; en los casos en los que el ACV sucedió durante el sueño, se fijó arbitrariamente las 07 horas como hora de aparición, en relación con la variación circadiana conocida de aparición de eventos cardiovasculares (380,381).

La severidad del daño neurológico fue valorada mediante la Escala de Mathew (EM) modificada por Gelmers (382), una escala que puntúa de 0 a 100 (mínima y máxima severidad, respectivamente) el grado de lesión neurológica (fig D1), al ingreso, y en los días 3 y 7. La valoración de la mejoría clínica (Índice de mejoría relativa, IMR) (382), fue evaluada según la fórmula:

IMR: $100 \times \text{puntos EM al día 7} - \text{puntos EM al ingreso} / 100 - \text{puntos EM al ingreso}$.

Se utilizó éste sistema de valoración con la idea de eliminar el error inducido por los pacientes con grave situación clínica, con bajas puntuaciones en la EM al ingreso. Los pacientes que fallecieron recibieron una puntuación de 0.

Se valoraron igualmente datos clínicos y epidemiológicos, entre los que se incluía la existencia de HTA, diabetes, tabaquismo, ACV previo, patología vascular periférica, cardiopatía isquémica, o insuficiencia renal.

8 pacientes recibieron Nicardipina por vía oral o por SNG, a dosis de 120 mg/día, de manera no randomizada. 9 pacientes recibieron tratamiento convencional, que básicamente consistió en antiagregantes plaquetarios (aspirina, 250 mg/d), y otras medidas médicas habituales, según la situación clínica (antihipertensivos, antiácidos, etc.)

D.5. Sepsis.

Se incluyeron en el estudio de sepsis-ET a 11 pacientes con infección grave, procedentes de los Servicios de UCI (10 casos), y Recuperación del Servicio de Cirugía-2 (1 paciente), del HUSC.

La edad media fue de 46.8 ± 19 años. 9 pacientes eran varones.

Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron los que definen el síndrome séptico y el shock séptico, según la descripción de Bone et al. (397); los pacientes deben presentar evidencia clínica de infección o al menos haber sido sometidos a instrumentación mecánica en el Hospital en las 48 horas previas. Deben presentar taquicardia (>90 latidos/min), taquipnea (>20 respiraciones/minuto, o más de 10 litros/min si estaban sometidos a ventilación mecánica), hipertermia o hipotermia ($>38.3^{\circ}\text{C}$ o $<35.3^{\circ}\text{C}$), y evidencia de mala perfusión orgánica demostrada por la presencia de alguno de los siguientes criterios: hipoxemia (<70 mmHg PO_2 , o $\text{PO}_2/\text{FiO}_2 <280$), no justificada por ninguna otra enfermedad pulmonar o cardiaca, elevación de los niveles plasmáticos de lactato, alteración del nivel de conciencia no justificada por ninguna causa orgánica o farmacológica, u oliguria (0.5 ml/kg durante al menos una hora).

Los pacientes fueron diagnosticados de shock séptico si cumplían criterios de síndrome séptico y además presentaban hipotensión refractaria a la administración de volumen (<90 mmHg de presión sistólica o caída de la TA superior a 40 mmHg mantenida durante más de una hora, en ausencia de hipovolemia, infarto de miocardio, tromboembolismo pulmonar, y sin la influencia de fármacos hipotensores)(398).

Los enfermos fueron incluidos en el estudio en el día en que cumplían los criterios señalados anteriormente, y ese día fue considerado como día 1. Se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de ET, CRA, ANF y C3d, durante tres días sucesivos (para la evaluación de las técnicas empleadas, ver sección de métodos generales). En los 11 casos disponemos de datos el día 1, en 5 casos el día 2, y en 3 casos el día 3.

Se evaluó su situación clínica mediante la puntuación en la escala APACHE-2 (Acute physiology and chronic health evaluation) (399), y en la escala SSS (Sepsis severity score), diseñada por Elebute y Stoner (400).

Se analizó la etiología de la sepsis o el shock séptico mediante el estudio rutinario de muestras biológicas (hemocultivos, cultivos de secrecciones, fluidos o abscesos). El manejo clínico de los pacientes fue el que se consideró mas apropiado por el médico responsable. Sólo en tres casos se dispone de datos hemodinámicos obtenidos a través de un catéter de Swan-Ganz, y en todos ellos destacaba un marcado descenso de las resistencias vasculares periféricas con elevación del gasto cardiaco y presión de enclavamiento pulmonar normal. Se consideró que los pacientes presentaban distress respiratorio ante la presencia de infiltrado pulmonar bilateral, hipoxemia refractaria y presión de enclavamiento pulmonar o venosa central normales.

Descripcion de los casos.

Por su escasa uniformidad, se expresan a continuación las características clínicas de cada paciente:

Caso 1. 32 años, mujer; insuficiencia renal crónica que había sido sometida a transplante renal en el pasado, en situación rechazo crónico del injerto, tratada con esteroides y ciclosporina A. Pancreatitis aguda necrótico hemorrágica, por lo que se realizó laparotomía con lavado peritoneal, extracción de fragmentos necróticos y drenaje. Infección de la herida quirúrgica, con demostración de E.Coli, Enterococo, Serratia Marcencens, y Enterobacter Cloacae en el exudado de la herida. Hemocultivos positivos a Candida Albicans. Recibió tratamiento con Imipenem, Vancomicina, Tobramicina, desarrollando shock que requirió la administración de Dopamina a 13 mcg/Kg/min, falleciendo finalmente en situación de fracaso multiorgánico y distress respiratorio.

Caso 2. 62 años, varón; linfoma de alto grado de malignidad diagnosticado coincidiendo con el ingreso hospitalario por shock séptico, de etiología desconocida. Recibió Imipenem, Vancomicina, Cotrimoxazol, Ceftacidima, así como Dopamina a 7 mcg/Kg/min, Dobutamina 17 mcg/Kg/min, y Adrenalina 1.5 mcg/Kg/min; falleció por fracaso multiorgánico y distress respiratorio, siendo negativos todos los exámenes microbiológicos.

Caso 3. 48 años, mujer; shock séptico por infección abdominal en relación con reciente cirugía de múltiples quistes hidatídicos. En los drenajes se aisló E.Coli y Klebsiella Pneumoniae. Recibió Imipenem,

Metronidazol, Tobramicina, Dopamina a 16 mcg/Kg/min, Dobutamina a 10 mcg/Kg/min, y varias sesiones de hemodiálisis. Falleció por fracaso multiorgánico y distress respiratorio.

Caso 4. 56 años, varón; shock séptico por perforación del colon secundaria a diverticulitis aguda. En el exudado peritoneal se aisló E.Coli y Enterococo. Recibió Gentamicina, Metronidazol, Ampicilina y Ceftacidima, así como Adrenalina 0.28 mcg/Kg/min, Dopamina 10 mcg/Kg/min, Dobutamina 12 mcg/Kg/min. Tras un prolongado tratamiento el paciente se recuperó.

Caso 5. 54 años, varón. Shock séptico por perforación gástrica en relación con adenocarcinoma del cuerpo gástrico. En el exudado peritoneal se aisló E.Coli, Citrobacter, Klebsiella Pneumoniae, y Enterococo. Recibió Metronidazol, Cefoxitina, Gentamicina, Dopamina 15.5 mcg/Kg/min, Dobutamina 17.7 mcg/Kg/min, y Adrenalina 1.5 mcg/Kg/min. Evolucionó favorablemente.

Caso 6. 54 años, varón; paciente alcohólico con sepsis por neumonía extrahospitalaria, aislándose en hemocultivos Klebsiella Pneumoniae. Recibió tratamiento antibiótico con Imipenem, evolucionando favorablemente.

Caso 7. 19 años, varón. Traumatismo craneoencefálico con infección de la herida craneal y neumonía nosocomial. En hemocultivos se aisló Pseudomona Aeruginosa y en la herida quirúrgica Proteus Mirabilis y Klebsiella Pneumoniae. Desarrolló síndrome séptico que evolucionó favorablemente con Ceftacidima y Gentamicina.

Caso 8. 75 años, varón; sufrió shock séptico en relación con perforación del colon secundaria a adenocarcinoma de rectosigma. Desarrolló una neumonía nosocomial, aislándose en el broncoaspirado Enterococo y en el exudado peritoneal Enterococo y Estafilococo Aureus meticilin resistente. Recibió Vancomicina, Amicacina, Metronidazol, Dopamina 10 mcg/Kg/min, Dobutamina 15 mcg/Kg/min, falleciendo por fracaso multiorgánico y distress respiratorio.

Caso 9. 20 años, varón; politraumatizado que desarrolló shock séptico en relación con neumonía intrahospitalaria. En hemocultivos se aisló Pseudomona Aeruginosa y Estafilococo aureus meticilin resistente. Recibió Ceftacidima, Vancomicina, Dopamina 7 mcg/Kg/min, Dobutamina 3 mcg/Kg/min. Evolucionó satisfactoriamente.

Caso 10. 29 años, varón. Síndrome séptico por mediastinitis secundaria a perforación esofágica; en los hemocultivos se aisló E.Coli. Evolucionó favorablemente tras recibir Gentamicina y Cefotaxima.

Caso 11. 66 años, varón; paciente diabético que sufrió un síndrome séptico por E.Coli aislado en la orina y en hemocultivos. Evolucionó favorablemente con Cefotaxima y Gentamicina.

E. Métodos.

E.1. Determinación de Endotelina-1.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos que contenían EDTA, previamente introducidos en un baño de hielo. La cantidad de sangre mínima recogida de cada paciente en cada toma fue de 5 ml. La frecuencia y el lugar de las determinaciones son las señaladas en cada protocolo.

Se procedió a su inmediata centrifugación a 4°C, a 1000 G durante 30 minutos. El plasma separado fue sometido a procesamiento inmediato, o almacenado a -70°C, hasta su determinación; el tiempo máximo de conservación fue de tres semanas.

El procedimiento de extracción de las muestras de plasma fue el siguiente: en columnas de extracción Sep-pak C-18 (Waters Ass.), se lavó con los siguientes agentes, en éste orden: 1. 8 ml de acetonitrilo 100%. 2. 8 ml de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 3. Muestra a determinar. 4. 2 ml de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 5. 2 ml de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 6. 1 ml de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 7. Elución de la ET con 3 ml de una solución con 60% de acetonitrilo y 40% de acetato amónico 0.2% a pH 4.0.

Las muestras fueron desecadas posteriormente con una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente para evaporar la mayor parte del acetonitrilo. Mas tarde se procedió al liofilizado del extracto acuoso. La recuperación de la ET añadida al plasma fue del 78±1.5%.

El procedimiento para la realización de radioinmunoensayo de ET fue el siguiente: las muestras previamente extraídas fueron disueltas con 300

μl de buffer, que contenía fosfato sódico 0.1M pH 7.4, 0.3% ClNa, 0.1% BSA (bovine serum albumin), y 0.1% de Tritón X-100. La curva estándar se realizó mediante diluciones sucesivas 1/2 en buffer ensayo a partir de la solución de ET de 5000 fmol/ml (Peninsula Lab., GB, NO.6901), cubriendo el rango 62.5 fmol/100 μl a 0.12 fmol/100 μl .

A las muestras a medir o los estándar (100 μl), se añadieron 100 μl de anti-ET-1 (Peninsula NO. RAS 6901), dilución 1/30.000.

Se incubó durante 48 horas a 4°C.

Se añadieron 100 μl de 125-I-ET-1 (Amersham Lab, GB), 2000 Ci/mmol (7000 cpm).

Se incubó durante 24 horas a 4°C.

Se procedió a la precipitación con un segundo anticuerpo, compuesto por 100 μl de GARG 1/25 (Goat Antirabbit Gammaglobulin), y 100 μl de NRS 1/50 (Normal Rabbit Serum).

Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadió 1 ml de PEG 6.25% (Polyethylene glycol).

La muestra se centrifugó durante 30 minutos a 3000 G.

Tras apirar el sobrenadante se procedió al contaje gamma del precipitado.

La variación intraensayo fue del 9%; la variación interensayos fue del 12%.

La especificidad del método fue del 100% con respecto a ET-1, con una reactividad cruzada del 37% con respecto a big-ET, 7% a ET-2, 7% a ET-3, y 0% con respecto a otros péptidos como ANF, BNF, vasopresina, angiotensina. Con respecto a sarafotoxina B6 fue del 6%.

Los valores normales de ET-1 fueron, en 20 sujetos sanos, de 0.54 ± 0.1 pg/ml.

E.2. Determinación del factor natriurético auricular (ANF).

El método de determinación de ANF fue diseñado por Gutkowska et al (379), y se realizó en el Laboratorio de Diabetes del Servicio de Medicina Interna 3, bajo la dirección de la Dra. Fernández Durango.

Las muestras de sangre para la determinación de ANF se recogieron en tubos mantenidos en un baño de hielo, que contenían 50 µl de pepstatina A, 50 µl de PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo), y 50 µl de EDTA. La adición de éstos agentes impide la activación de proteasas que degradan el ANF a medir. Se recogieron 5 ml de sangre en cada toma, con una frecuencia determinada en cada protocolo.

Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 4°C, durante 15 min a 3500 rpm. El plasma obtenido se congeló a -70°C, hasta su procesamiento, con una diferencia de tiempo en ningún caso superior a las 3 semanas.

Previamente a la realización del RIA, se procedió a extraer el ANF de las muestras de plasma, mediante cartuchos de Sep-pak C18 (Waters Ass.). El procedimiento de extracción fue el siguiente: 1/ Lavado con 8 ml de acetonitrilo 100%. 2/ Lavado con 8 ml de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 3/ Lavado con 2 ml de plasma. 4/ Elución del ANF con 60% de acetonitrilo-100% y 40% de acetato amónico 0.2% a pH 4.0. 5/ Pase por una corriente de N₂ para la evaporación del acetonitrilo.

El residuo extraído se disolvió en un buffer de fosfato 0.1M a pH 7.4 con 0.1% de ácido trifluoroacético.

Para la realización del RIA, se utilizó un buffer que contenía fosfato sódico 0.1M, cloruro sódico 0.3%, bis-trimetisilylacetamina 0.1% y tritón X-100 0.1%. El anticuerpo anti-ANF (17/12) fue proporcionado por Lab. Península (GB), diluido a 1:30.000.

La curva estándar se preparó mediante diluciones sucesivas 1/2 de ANF marcado con 125-I (Lab. Península, GB), entre 3.9 y 3900 pg/ml.

A 100 μ l del estándar o la muestra a medir se añadieron 100 μ l de anti-ANF 1:30.000.

Se incubó durante 24 horas a 4°C.

Se añadieron 100 μ l de 125-I-ANF.

Se incubó durante 24 horas a 4°C.

Se realizó la precipitación con un segundo anticuerpo, que contenía 100 μ l de GARG 1/25 (Goat Antirabbit gammaglobulin), y 100 μ l de NRS 1/35 (Normal rabbit serum).

Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se añadió 1 ml de dietilenglicol 8000 6.25%.

Se centrifugó durante 20 minutos a 4000 rpm.

Tras aspirar el sobrenadante se procedió al contaje gamma del precipitado.

La variación intraensayo fue del 4%. La variación interensayos fue del 6%.

En 20 sujetos sanos los valores plasmáticos de ANF en nuestro Laboratorio, fueron de 5.84 ± 3.9 pg/ml.

E.3. Determinación de renina.

El método utilizado para la determinación de la concentración de renina activa (CRA), fue un ensayo inmunoradiométrico de tipo sandwich (IRMA). Se realizó mediante un kit proporcionado por la casa comercial ERIA Diagnostics Pasteur. Este sistema utiliza dos anticuerpos monoclonales, uno de ellos dirigido contra las dos formas de renina (activa, e inactiva o prorrenina); el segundo anticuerpo monoclonal marcado con ^{125}I , reconoce sólo la forma activa. El procedimiento ha sido validado y descrito previamente (296,297). Brevemente, el ensayo constaba de las siguientes fases: se obtuvieron muestras de 5 ml de sangre en cada toma y en cada paciente, con la frecuencia indicada en cada protocolo, en tubos de vidrio con EDTA, a temperatura ambiente; se centrifugaron inmediatamente las muestras a 4°C , durante 15 min a 2500 rpm. El plasma extraído se procedió a su inmediata determinación o se congeló a -70°C hasta su procesamiento, un máximo de 3 semanas. Se incubaron los estandar y las muestras (250 μl) en presencia de un exceso del primer anticuerpo; lavado, e incubación de los complejos insolubles con el segundo anticuerpo marcado con ^{125}I . Lavado y eliminación de la fracción libre, procediendo a la medición en una gammacámara de la actividad unida a la fase sólida.

La sensibilidad del ensayo fue elevada, con niveles mínimos detectables de CRA de 3.5 pg/ml. La variación interensayos fue de 6%. La variación intraensayo fue del 4%.

Los valores normales de CRA en 12 sujetos sanos fueron de 9.5 ± 2.0 pg/ml.

E.4. Determinación de la fracción 3d del complemento.

Los valores de la fracción 3d del sistema del complemento se determinaron mediante ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), utilizándose un anticuerpo anti-humano de conejo (Dakopatts, Copenhagen), según técnica descrita previamente (437)

Las muestras de sangre (10 ml) de los pacientes incluidos en el protocolo de Sepsis, recogidas en tubos con 100 µl de EDTA fueron sometidas a precipitación añadiendo 50 µl de Veronal salino 25 mM a pH 7.4 y 200 µl de PEG 24% (6000 Sharlem) EDTA 20mM (Sigma). Tras mantener 1.30 h. a temperatura ambiente se procedió a centrifugar a 1500 g a 4°C durante 30 min. Posteriormente se recoge el sobrenadante en el que el plasma queda diluido a 1/8.

Para preparar la curva estándar se activó el complemento de 5 ml de sangre heparinizada con 5 u. de CVF (Cobra Venom Factor, Cordis Lab.), durante 19 horas a 37°C en agitación lenta continua. Tras su centrifugación el plasma sobrenadante fue precipitado de igual forma que el problema.

Para la realización del ELISA se utilizaron placas de EIA de fondo plano Costar recubiertas con inmunoglobulina de conejo antiC3d humano (Dakopatts Denmark), a 5 ng/ml (500 ng por pocillo) en PBS, incubando a 4°C durante 18 horas. Posteriormente fueron lavadas con tampón citrato salino-Tween y neutralizados con 200 µl/pocillo de PBS-BSA al 1% durante 1 hora. Como control de calidad, una vez en cada placa la adición de C3d fue omitida y sustituida por buffer.

Tras el lavado con citrato salino-Tween se procedió a incubación durante 1.30 h de 100 µl/pocillo de la curva estándar y de las muestras

problema por duplicado.

Se elaboraron siete puntos de curva partiendo de una primera dilución de 1/12.800 del plasma tratado con CVF al que se asignó un valor arbitrario de 1000 U/ml de C3d. Las muestras problema se tratan a la dilución que quedan tras la precipitación.

Tras la incubación y lavados correspondientes se añade antiC3d marcado con Biotín-N hidroxisuccinimida (ATIQ) a una dilución 1/10.000 durante 60 minutos y después Avidina peroxidada a dilución 1/2000 durante 15 minutos. Como substrato se utilizó Ortofenildiamina (OPD, Merck), deteniéndose la reacción enzimática a los 10 minutos con HCl al 10%. La lectura se realiza a 492 nm en un espectrofotómetro STL 210 (Kontron Analytical).

Los resultados se expresan en Unidades arbitrarias/ml (UA/ml).

En 26 sujetos sanos, los niveles de C3d en nuestro laboratorio fueron de 12.53 ± 3.64 UA/ml.

E.5. Análisis estadístico.

La comprobación del ajuste de la distribución de los datos experimentales a una curva de probabilidad normal, se hizo mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para distribuciones continuas. Cuando ésta dió positiva, se realizó la comparación de variables numéricas mediante un test "t" de Student, para muestras no emparejadas. La comparación entre valores de índole cualitativa se realizó mediante el análisis de X-cuadrado. La relación entre variables cualitativas y cuantitativas se realizó mediante el análisis de la varianza de una entrada (Anova 1). Cuando el número de datos en cada subgrupo era inferior a 10, en la relación entre valores cualitativos y cuantitativos, se hizo el análisis mediante pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney, W de Wilcoxon, C1 de Fisher-Yates, y H de Kruskal-Wallis)(436).

El grado de asociación entre dos variables de índole cuantitativa se analizó mediante la prueba del coeficiente de correlación.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar; se consideran significativos valores de probabilidad inferiores a 0.05.

Los datos se han procesado y analizado utilizando un paquete informático integrado comercial, compuesto por una base de datos y un tratamiento estadístico (RSigma, Horus Hardware).

F. Resultados

F.1. Clampaje aórtico infrarrenal.

Los niveles basales de ET en ésta serie de pacientes fueron de 1.21 ± 0.5 pg/ml ($p < 0.05$ con respecto a controles: 0.54 ± 0.1 pg/ml). Tras la inducción anestésica, antes de la realización del clampaje aórtico, los valores de ET fueron de 1.38 ± 0.5 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles). Durante la isquemia inducida por 5 minutos de clamp, la ET fue de 1.98 ± 1.1 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles). A los 5 minutos de liberación del clamp, los niveles de ET fueron de 4.42 ± 0.9 pg/ml ($p < 0.01$ frente a controles), y a los 30 minutos de 6.08 ± 2.0 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles). Estos resultados se expresan en la figura A1.

F.2. Angioplastia coronaria-angina inestable.

Las características clínicas de los pacientes se expresan en la figura B1. 6 pacientes eran varones. La edad media fue de 56±9 años (rango 44-72). Los factores de riesgo cardiovascular que se encontraron con mas frecuencia fueron: hipertensión arterial 3 pacientes (42.9%), tabaquismo 5 (71.4%), hiperlipidemia 3 (42.9%), diabetes 3 (42.9%); en todos los enfermos se pudo documentar la presencia de algún factor de riesgo.

2 pacientes habían sufrido un infarto de miocardio previo (28.6%), en un territorio no relacionado con la lesión coronaria para la que se realizó la actual ACTP. Presentaban síntomas de insuficiencia cardiaca (grados de la NYHA), como media 0.4 (rango 0-2).

7 pacientes (100%), recibieron nifedipina, 40 mg/día por vía oral. 5 (71.4%), aspirina, 250 mg/día. 2 (28.6%), enalapril, 10 mg/día. 2 (28,6%) heparina sódica intravenosa, a dosis que prolongaban 2.5 veces el tiempo parcial de tromboplastina. 6 (85.7%), nitratos, en forma de parches dérmicos o en comprimidos de liberación prolongada. 1 recibía furosemida, 40 mg/día, y 2 atenolol, 100 mg/día.

En 5 casos la lesión se localizó en la arteria descendente anterior. En 1 caso en la coronaria derecha, y en el restante en la arteria circunfleja. En 5 casos la lesión era proximal, y en 2 en el territorio medio.

En 4 casos la morfología de la lesión era focal (menor de 0.5 cm), en 2 casos tubular (entre 0.6 y 1 cm), y en uno difusa (superior a 1 cm).

En 5 casos la apariencia de la lesión era excéntrica, y en 2, concéntrica. En 5 casos la lesión era de forma lisa y en 2 irregular.

El grado de estenosis previa a la ACTP fue del 82.8%. En todos los casos la ACTP se realizó con éxito, con estenosis residual inferior al 50%. La estenosis residual media fue del 33.7%. El número de inflados medio para dilatar la lesión fueron 2.5 (2-4). Los pacientes presentaron dolor como media 28 segundos tras el inflado del balón de angioplastia.

Ninguna ACTP se complicó, salvo por la presencia de vasoespasmo autolimitado en 2 pacientes; no se objetivó infarto de miocardio tras la ACTP, en ningún caso.

Los niveles plasmáticos de ET fueron los siguientes:

Arteria coronaria, pre-ACTP: 1.67 ± 0.8 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles). Post-ACTP: 2.65 ± 3.1 pg/ml (p :ns frente a controles). No hubo diferencia significativa entre los valores de ET en arteria coronaria antes y después de la ACTP.

Seno coronario, pre-ACTP: 2.17 ± 1.1 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles); post-ACTP: 1.27 ± 0.4 pg/ml ($p < 0.01$ frente a controles). No hubo diferencia entre los valores de ET en seno coronario antes y después de la ACTP.

Arteria femoral, pre-ACTP: 1.97 ± 1.3 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles). Post-ACTP: 1.83 ± 1.4 pg/ml ($p = 0.05$, ns frente a controles). No hubo diferencias en los niveles de ET en arteria femoral antes y después de la ACTP.

Vena femoral, pre-ACTP: 1.79 ± 1.4 pg/ml (p =ns frente a controles). Post-ACTP: 1.57 ± 0.6 pg/ml ($p < 0.01$ frente a controles). No se apreciaron diferencias significativas en los niveles en sangre venosa periférica antes y después de la ACTP. Estos resultados se expresan en las figuras B2, B3, B4 y B5.

Los 7 pacientes pudieron ser evaluados nuevamente al cabo de 14 meses.

En 4 pacientes se objetivó reestenosis (57.1%), realizándose a 3 de ellos nueva ACTP, con la colocación de una prótesis endovascular. En el paciente restante se comprobó reestenosis del 100%, pero sin ningún síntoma. 3 pacientes (43.9%) se encontraban bien, sin lesiones.

F.3. Infarto agudo de miocardio.

Las características clínicas se expresan en la figura C1. 7 pacientes eran varones. La edad media de los pacientes fue de 57.7 ± 9.3 años (49-73). Los factores de riesgo encontrados con mas frecuencia fueron tabaquismo, 7 pacientes, hipertensión arterial 3, arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores 3, hiperlipidemia 3, diabetes 2, y angina de esfuerzo estable 2. Ningún paciente había sufrido un infarto de miocardio previamente, ni presentaban insuficiencia renal. Las horas de evolución del dolor antes de la toma de la primera muestra fueron 3.6 ± 2.2 . El pico máximo de CPK (creatin fosfoquinasa) fue de 1194.6 ± 801.9 U/l, que se presentó a una media de 17.75 ± 2 horas de comienzo de la clínica. Ningún paciente presentaba síntomas o signos de insuficiencia cardiaca, y ninguno desarrolló clínica sugestiva de ésta durante su evolución, ni arritmias graves que requirieran el uso de medicamentos antiarritmicos. La localización de los IAM fue: anteroseptal en 4 casos, anterolateral en 2 e inferior en 4. El tratamiento que recibieron durante su estancia en UCI fue: nitratos por vía intravenosa, oral o en parche en todos los casos, verapamil en 2 casos, heparina sódica por vía intravenosa (a dosis que prolongaban 2.5 veces el tiempo de tromboplastina), en 6 casos; heparina cálcica 7500 u/12 horas por vía subcutánea, en 2 casos. Aspirina 250 mg/día en 5 casos. En 6 casos se realizó fibrinólisis, en 4 de ellos con estreptoquinasa y en 2 con rTPA, que se consideró eficaz por la presencia de criterios de reperfusión, entre los que destacan la minimización del área de necrosis y la presencia de un pico precoz de CPK (el pico de CPK entre los que se realizó fibrinólisis apareció a

las 9 horas frente a las 17.73 horas en los que no se hizo fibrinólisis, $p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes en relación al valor máximo de CPK.

Los resultados de ET, ANF y CRA se expresan gráficamente en las figuras C2, C3 y C4. Los valores de ET se encontraron elevados significativamente frente a los controles durante las 24 horas de evolución del IAM, y fueron los siguientes: (ET1 se refiere al ingreso, ET2 a la muestra obtenida a las 4 horas, ET3 a las 8 horas, y ET4 a las 24 horas). Los valores plasmáticos de ET1 en el ingreso en UCI, en el conjunto de pacientes, fue de 1.32 ± 0.4 pg/ml, cifras superiores a las de los controles, con una $p < 0.001$ (controles, ET: 0.57 ± 0.41 pg/ml, $n=16$). ET2: 1.94 ± 0.21 (superior a controles, $p < 0.001$). ET3: 1.71 ± 0.64 (superior a controles, $p < 0.001$). ET4: 4.60 ± 3.26 (superior a controles, $p < 0.01$).

Los valores de ANF mostraron una evolución tiempo-dependiente, encontrándose elevados al ingreso y a las 24 horas. ANF1: 59.71 ± 13.61 pg/ml ($p < 0.001$ frente a controles, 5.84 ± 3.96 pg/ml). ANF2: 20.55 ± 26.74 ($p=ns$ frente a controles). ANF3: 34.55 ± 45.44 ($p=ns$). ANF4: 55.6 ± 27.34 ($p < 0.001$ vs controles).

La CRA se encontró elevada durante las primeras 24 horas de evolución del IAM. CRA1: 38.24 ± 14.1 pg/ml ($p < 0.001$ frente a controles, 14 ± 7 pg/ml). CRA2: 44.48 ± 15.4 ($p < 0.001$). CRA3: 29.68 ± 5.86 ($p < 0.001$). CRA4: 67.08 ± 22.8 ($p < 0.001$).

Los valores de ET en los pacientes a los que se realizó fibrinólisis diferían de los que no la recibieron. Estas diferencias se expresan gráficamente en la figura C5. Los resultados fueron los siguientes:

Con fibrinólisis, ET1: 1.42 ± 0.44 pg/ml; ET2: 2.03 ± 0.17 pg/ml; ET3: 1.98 ± 0.43 pg/ml; ET4: 6.86 ± 1.85 pg/ml. Sin fibrinólisis, ET1 1.16 ± 0.32

pg/ml; ET2: 1.83 ± 0.22 pg/ml; ET3: 1.31 ± 0.75 pg/ml; ET4: 1.2 ± 0.8 pg/ml. No hubieron diferencias entre las muestras de ET1, ET2 ni ET3, aunque se apreció una tendencia hacia la significación estadística en las muestras de ET2 y ET3, que fueron superiores en los casos de fibrinólisis, con una p de 0.08 y 0.05, respectivamente. Los valores plasmáticos de ET4 (muestra a las 24 horas del ingreso) eran más altos en los pacientes que recibieron fibrinólisis ($p < 0.001$).

No se apreciaron diferencias entre los valores de ANF entre los pacientes con o sin fibrinólisis, aunque las muestras de ANF1, ANF2 y ANF4 eran lo suficientemente pequeñas como para no poder obtener conclusiones estadísticas firmes.

Los valores de CRA no diferían entre los dos grupos en las muestras obtenidas al ingreso, a las 4 y 8 horas. Sin embargo, eran significativamente superiores entre los pacientes que recibieron fibrinólisis, a las 24 horas (82.1 ± 12.1 frente a 44.57 ± 13.7 , $p < 0.001$).

Se apreció correlación lineal significativa ($p < 0.05$) entre los valores de ET y CRA. Los valores de ET y CRA se relacionaron positivamente, con coeficientes de correlación que variaron entre +0.64 (figura C6) para las muestras al ingreso, y +0.87 a las 24 horas. Se apreció una correlación inversa entre CRA y ANF en las muestras a las 24 horas, con $r: -0.73$ ($p < 0.05$).

F.4. Accidente vascular cerebral isquémico.

1. ACV agudo (evaluación al ingreso en el Hospital).

De los 17 pacientes, 10 eran varones. La edad media fue de 73.6 ± 8.7 años (rango 57-92). 13 pacientes (76.5%) eran hipertensos; presentaban hiperlipemia conocida 6 (35.3%). 5 pacientes eran diabéticos (29.4%). 9 fumadores activos (52.9%). 4 (23.5%) pacientes habían presentado en el pasado (mas de dos meses), clínica sugestiva de accidentes isquémicos transitorios o ACV establecido. 1 paciente (5.4%), presentaba clínica de claudicación intermitente en miembros inferiores. 4 (23.5%) presentaban evidencia de cardiopatía isquémica por infarto de miocardio previo. 3 pacientes (17.6%) habían sido diagnosticados de insuficiencia renal crónica, en relación con HTA.

El intervalo entre la aparición de los síntomas y la toma de la primera muestra fue de 20.6 ± 9.7 horas.

La tensión arterial sistólica (TAS) al ingreso fue de 149.4 ± 24.3 mmHg; la tensión arterial diastólica (TAD) fue de 87.6 ± 19.8 mmHg. La puntuación en la EM al ingreso fue de 48.7 ± 22 puntos.

Los niveles plasmáticos de ET en vena fueron de 6.44 ± 4.7 pg/ml ($p < 0.001$ frente a controles, $ET = 0.54 \pm 0.1$ pg/ml). En arteria, los valores de ET fueron de 6.22 ± 5.1 pg/ml ($p < 0.05$ vs controles). No hubo diferencia significativa entre los valores de ET arterial o venosa.

Los niveles plasmáticos de ANF fueron de 128.4 ± 122.4 pg/ml, superiores estadísticamente a los de sujetos sanos ($ANF = 6.83 \pm 3.4$ pg/ml, $p < 0.05$).

La CRA fue de 39.7 ± 4.2 pg/ml; sus valores no diferían ($p = 0.07$) con respecto a controles, $CRA = 14 \pm 2$ pg/ml.

No existió correlación lineal entre los valores de ET, ANF, CRA, ni

con la puntuación en la EM. Sin embargo, los pacientes con menos de 45 puntos en la EM presentaban niveles plasmáticos de ET venosa superiores a los que presentaban más de 45 puntos, $ET = 4.08 \pm 3.9$ pg/ml frente a $ET = 8.80 \pm 4.4$ pg/ml, respectivamente ($p < 0.05$) (figura D2).

6 pacientes (35.3%) fallecieron a lo largo de la evolución del accidente vascular, por causas relacionadas directamente con éste. Los pacientes que fallecieron presentaban al ingreso valores en la EM inferiores a los que no fallecieron (26.33 frente a 61.72 puntos, $p < 0.001$). No hubieron diferencias significativas entre los valores plasmáticos de ET arterial ni venosa, ANF, ni CRA entre los pacientes que fallecieron y los que no.

Se apreció una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre los valores de ANF al ingreso y el índice de mejoría relativa a la semana de evolución, independiente del tratamiento con nicardipina ($r = +0.71$) (figura D3). Igualmente, la TAD se correlacionó de forma negativa con el IMR ($r = -0.59$) (figura D4). No hubo correlación entre los valores de ET, CRA, edad, EM, ni TAS con el IMR.

2. Seguimiento clínico a la semana de aparición del ACV.

A. Pacientes tratados de forma convencional.

9 pacientes fueron seguidos clínicamente durante una semana tras la aparición del ACV; 5 eran varones. La proporción de factores de riesgo cardiovascular eran los siguientes en éste grupo: HTA 7 (77.8%); hiperlipemia 5 (55.6%); diabetes 3 (33.3%); tabaquismo 5 (55.6%). La edad media fue 73.5 ± 10.2 años.

La TA sistólica al ingreso fue 151.11 ± 20.2 mmHg; la TA diastólica fue 92.22 ± 23.8 mmHg.

El intervalo entre la aparición de los síntomas y la toma de la primera muestra fue de 19.55 ± 6.8 horas.

La puntuación en la EM fue: día 1 (ingreso): 39.77 ± 18.2 ; día 3: 50 ± 21 ; día 7: 64 ± 11.7 . (figura D5).

Los valores plasmáticos de ET venosa en éste grupo fueron: Ingreso, 6.16 ± 5.8 pg/ml (significativamente superiores a los valores de ET en sujetos normales, $p < 0.05$). Día 3, 6.08 ± 8.27 pg/ml ($p = 0.27$, -ns- frente a controles). Día 7, 13.3 ± 11.8 pg/ml ($p = 0.11$ frente a controles). Estos resultados se expresan graficamente en la figura D6.

Los valores de ET arterial fueron: Ingreso, 4.99 ± 5.63 pg/ml. Día 3, 2.94 ± 2 pg/ml. Día 7, 16.61 ± 14.67 pg/ml. No diferían con respecto a los valores de ET en sujetos normales.

Los valores plasmáticos de ANF fueron: Ingreso 97.2 ± 115.7 pg/ml. Día 3, 93.1 ± 116.5 pg/ml. Día 7, 69.85 ± 77.13 pg/ml. No diferían con respecto a controles en ninguno de los tres días (figura D7).

Los valores de CRA fueron similares a los de los controles durante los tres días: Ingreso, 50.47 ± 49.9 pg/ml. Día 3, 27.93 ± 6.76 pg/ml. Día 7,

26.9±6.76 pg/ml (figura D7).

El índice de mejoría relativa fue de -13.09±38.8 (figura D8).

5 pacientes (55.6%) fallecieron a lo largo de la evolución por causas directamente relacionadas con el ACV.

En los casos en los que el índice de mejoría global fue inferior a cero, todos los pacientes fallecieron; los valores plasmáticos de ET al ingreso en los pacientes con índice de mejoría inferior a cero fueron de 10.48±6.7 pg/ml, frente a 2.13±1.9 pg/ml ($p<0.05$), entre los que la mejoría global fue superior a cero (figura D9). Los valores de ET al ingreso en muestras venosas no diferían, sin embargo, entre los pacientes que fallecieron (ET: 8.89±6.24 pg/ml) y los que no fallecieron (ET: 2.79±2.21 pg/ml). No hubieron diferencias significativas entre los valores de ET arterial, ANF, ni CRA, en ninguno de los tres días entre los pacientes que fallecieron y los que no.

B. Pacientes tratados con nicardipina.

8 pacientes recibieron, tras el diagnóstico de ACV isquémico, tratamiento con nicardipina 120 mg/día por vía oral o SNG. El comienzo del tratamiento fue en todos los casos tras la primera determinación de ET, CRA y ANF.

La edad media fue de 73.5 ± 7.4 años. 5 pacientes eran varones; los factores de riesgo vascular no diferían significativamente de los del grupo que recibieron tratamiento convencional, y entre ellos se incluían HTA, 6 pacientes (75%), hiperlipemia, 1 (12.5%), diabetes 2 (25%), y tabaquismo 4 (50%). 1 paciente había presentado previo al desarrollo del actual ACV, síntomas de accidente isquémico transitorio. 3 pacientes (37.5%) presentaban cardiopatía isquémica (antiguos IAM). 1 paciente presentaba insuficiencia renal crónica, relacionada con HTA de larga evolución.

La TA sistólica al ingreso fue 147.5 ± 29.6 mmHg; la TA diastólica fue 82.5 ± 13.8 mmHg.

El intervalo entre la aparición de los síntomas y la toma de la primera muestra fue de 22.1 ± 13.5 horas.

La puntuación en la EM fue, al ingreso, 58.7 ± 23.6 ; al tercer día, 66.2 ± 26.3 . Al séptimo día, 74.7 ± 19.3 (figura D5).

El índice de mejoría relativa según la fórmula descrita previamente, fue de $+27.08 \pm 32.6$ (figura D8).

Los valores plasmáticos de ET en muestras venosas fueron los siguientes: ingreso, 6.28 ± 3.8 pg/ml (significativamente superior a controles, $p < 0.01$). Día 3, 16.75 ± 9.2 pg/ml ($p < 0.01$ frente a controles). Día 7, 6.08 ± 4.3 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles) (figura D10).

Los valores de ET plasmática arterial fueron: día 1, 7.27 ± 4.9 pg/ml

($p < 0.05$ frente a controles). Día 3, 9.48 ± 6.1 pg/ml ($p < 0.01$ frente a controles). Día 7, 4.75 ± 3.3 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles).

Los valores de ANF plasmático fueron similares a los de los controles, durante las tres muestras. Día 1, 167.39 ± 135.7 pg/ml. Día 3, 342.41 ± 308.2 pg/ml. Día 7, 511.85 ± 501.6 pg/ml.

Los valores de CRA fueron: día 1, 20.87 ± 12.6 pg/ml. Día 3, 24.4 ± 12.5 pg/ml. Día 7, 104.6 ± 5.6 pg/ml. No diferían con respecto a controles en ninguna de las tres determinaciones.

1 paciente (12.5%) falleció a lo largo de la evolución por causas directamente relacionadas con el ACV.

No se observó ningún efecto adverso atribuible al tratamiento con nicardipina; aunque en general se apreció una disminución de la tensión arterial durante los 7 días de tratamiento, las diferencias no fueron significativas con respecto a los pacientes que recibieron tratamiento convencional.

C. Diferencias entre los dos grupos.

La comparación de las características clínicas de los pacientes queda reflejada en la figura D11. No se apreciaron diferencias en cuanto a la edad de los pacientes, sexo, tiempo entre el comienzo de los síntomas y la toma de la primera muestra, HTA, hiperlipemia, diabetes, tabaquismo, ACV isquémico transitorio previo, patología vascular en extremidades inferiores, cardiopatía isquémica, insuficiencia renal crónica, TA sistólica y diastólica al ingreso, ni en cuanto a la puntuación en la EM en ninguno de los días. Los valores plasmáticos de ET, ANF y CRA fueron similares en ambos grupos. Los valores en la EM el día 7, los valores de ET arterial, ANF y CRA al tercer día, así como los de ET venosa, ANF y CRA al séptimo día, no fueron comparables por el escaso número de la muestra.

La proporción de exitus fue superior en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento convencional (12.5% frente a 55.5%, $p < 0.05$).

El índice de mejoría global fue superior en los pacientes que recibieron tratamiento con nicardipina (+27.08 frente a -13.09, $p < 0.05$) (figura D8).

F.5. Sepsis.

7 pacientes fueron diagnosticados de shock séptico y 4 de síndrome séptico. Los gérmenes involucrados con mas frecuencia fueron los gram negativos (6 casos, 54.5%); en 4 (36.3%) se apreció infección por gérmenes mixtos (gram negativos, positivos y/o anaerobios). En 1 caso la causa de la infección permaneció desconocida (9%) (figura E1).

4 pacientes (36.3%) fallecieron en relación con shock séptico; 7 sobrevivieron a la infección y pudieron ser dados de alta (63.6%). Todos los pacientes que fallecieron presentaban distress respiratorio; ninguno de los pacientes que sobrevivieron a la infección presentaron ésta complicación.

7 pacientes (63.6%), requirieron soporte vasoactivo con aminos simpaticomiméticas durante mas de 48 horas (7 Dopamina, 6 Dobutamina, 3 Adrenalina).

La puntuación media en la escala Apache 2 fue de 23.6 ± 7.5 el día 1 (11 pacientes), el día 2: 21.2 ± 7.4 (5 pacientes), y el día 3: 21.6 ± 10 (3 casos).

En la escala SSS la puntuación media fue, día 1: 17.4 ± 4.5 (11 casos); día 2: 15.8 ± 2.1 (5 casos); día 3: 14.6 ± 1.5 (3 casos).

La Creatinina plasmática en el día 1 fue de 2.85 ± 2.2 mg/dl; la pO_2 89.1 ± 28.6 mmHg; la diferencia alveolo- arterial de oxígeno se calculó en los pacientes sometidos a ventilación mecánica (5 pacientes), y fue de 515.4 ± 144 . La frecuencia cardiaca el día 1 fue de 123.6 ± 6.4 L/min. La presión arterial media fue de 81.7 ± 22.9 mmHg (74.1 ± 26.1 en pacientes con shock séptico y 95 ± 4 en sepsis, $p=0.08$)

Estos valores se expresan en la figura E2.

Niveles de ET-1

Los niveles plasmáticos de ET en la primera muestra obtenida, en el global de pacientes fueron de 2.41 ± 0.96 pg/ml (estadísticamente superior a los sujetos control, $p < 0.001$). Los pacientes con síndrome séptico presentaban unos niveles de ET de 2.92 ± 1.13 pg/ml, y los pacientes con shock séptico 3.08 ± 0.75 pg/ml; no hubieron diferencias entre los niveles de ET entre los pacientes con sepsis o shock séptico, y ambos fueron superiores a los valores normales. En los 5 casos en los que se obtuvo muestra el segundo día, los valores de ET fueron de 2.97 ± 1.34 pg/ml, y el tercer día 5.31 ± 6.97 pg/ml, ambos resultados significativamente superiores a los valores normales (figura E3).

No se apreció correlación significativa entre los valores de ET y la puntuación en las escalas de severidad clínica Apache 2 ni SSS; tampoco se relacionó con la presencia o no de shock ni con el exitus. Los valores de ET eran similares entre los pacientes que presentaban Creatinina plasmática superior a 1.5 mg/dl (ET= 2.24 ± 0.3), y en aquellos en los que la función renal era normal (ET= 2.16 ± 0.8), $p = \text{ns}$.

Los valores de ET en infecciones graves producidas por gérmenes gram negativos fueron de 2.92 ± 1.13 pg/ml; en el grupo de infecciones mixtas (anaerobios y gram positivos), fueron de 1.94 ± 0.75 pg/ml, diferencia no significativa.

No se encontraron diferencias entre los valores de ET entre los pacientes que recibieron aminas vasopresoras como tratamiento de la hipotensión refractaria a la expansión de volumen, y los que no; así, los que las recibieron presentaban unos niveles de 2.08 ± 0.75 pg/ml, y los que no las recibieron 2.92 ± 1.13 pg/ml.

Se apreció una correlación positiva estadísticamente significativa

($p < 0.05$) entre los valores de ET y los de ANF, con una $r = +0.71$ (figura E4).

Niveles de ANF

Los niveles plasmáticos de ANF se encontraron elevados con respecto a los valores normales en pacientes con infecciones graves, siendo en el conjunto de pacientes de 68.37 ± 57.7 pg/ml ($p < 0.01$). En pacientes con síndrome séptico los niveles de ANF eran de 82.9 ± 66.84 pg/ml ($p = 0.056$, ns frente a controles), y en el shock séptico 62.15 ± 56.97 pg/ml ($p < 0.05$ frente a controles) (figura E5).

No se encontró relación estadística entre los niveles plasmáticos de ANF y la puntuación en las escalas de severidad clínica Apache 2 ni SSS, ni con el exitus; tampoco se encontraron diferencias entre los pacientes con insuficiencia renal, uso de aminas vasopresoras, ni con las cifras de presión arterial.

Los valores de ANF plasmático eran superiores en los pacientes con infección grave producida por gérmenes gram negativos (ANF = 95.77 ± 50.4 pg/ml), que en aquellos con infección por gérmenes anaerobios o gram positivos (ANF = 31.63 ± 23 pg/ml, $p < 0.05$).

Niveles de C3d

Los niveles plasmáticos de C3d se encontraron significativamente elevados durante todo el periodo del estudio frente a los controles (C3d = 12.53 ± 3.64 UA/ml, $n = 26$). El primer día fueron de 49.27 ± 24.95 UA/ml ($n = 11$), $p < 0.001$. El 2° día fueron de 55.85 ± 24.22 UA/ml ($n = 7$), $p < 0.01$, y el 3° día 63.6 ± 23.71 UA/ml ($n = 5$), $p < 0.01$ (figura E6).

No se encontró relación entre el tipo de germen implicado en la sepsis y los niveles plasmáticos de C3d; tampoco se encontraron diferencias entre los pacientes con síndrome séptico o shock. Los niveles

plasmáticos de C3d no variaban significativamente entre los pacientes que fallecieron y los que sobrevivieron. No se encontró relación estadística entre la gravedad de la infección y los niveles plasmáticos de C3d.

G. DISCUSION.

G.1. Clampaje aórtico infrarrenal.

El clampaje aórtico infrarrenal induce una vasoconstricción renal transitoria, con descenso del filtrado glomerular, de causa incompletamente explicada (298). Se ha sugerido que la activación del sistema nervioso simpático, junto con un descenso del volumen efectivo circulante y la activación del sistema renina-angiotensina, son los mecanismos responsables de ésta reacción al clampaje aórtico. Sin embargo, esta disminución del flujo sanguíneo renal no es posible prevenirla mediante el tratamiento con manitol o dopamina (299). Se ha descrito también elevación de la presión arterial en el periodo posterior al clampaje (298). El efecto de la ET sobre la circulación renal es similar al descrito en la insuficiencia renal postclampaje: marcada vasoconstricción renal, con disminución del filtrado glomerular y disminución del volumen urinario y la natriuresis (166). Por otra parte, se ha comprobado que la elevación de los niveles plasmáticos de ET dos veces por encima del valor normal se asocia con efectos biológicos, entre los que destaca el aumento de las resistencias vasculares periféricas y vasoconstricción en el territorio renal (96). Es posible por tanto, que los valores de ET observados en nuestros pacientes pudieran influir en la función renal tras el clampaje.

La causa de la elevación de ET en ésta situación posiblemente se relacione con la isquemia. Sin embargo, los estudios in vitro han demostrado que la vasoconstricción inducida por la hipoxia es de corta

duración y fácilmente reversible (300). La sensibilidad de los diferentes territorios vasculares parece ser similar en cuanto a la vasoconstricción inducida por hipoxia o anoxia (301,302). En segmentos arteriales pulmonares en cultivo la hipoxia moderada no influyó en la secreción de ET (303), pese a que se ha comprobado que la hipoxia mantenida durante 30 minutos eleva la ET en un 171% en un estudio in vitro de segmentos de arteria mesentérica (73). El efecto vasoconstrictor de la ET se incrementa en situaciones de hipoxia, y tras el bloqueo farmacológico de la producción de NO (304). La isquemia induce una cascada de hechos, entre los que se incluyen la deplección de las reservas de adenosin trifosfato (ATP)(305), acumulación de protones (306), y la difusión de precursores de purinas (307) y potasio (308) al medio extracelular; junto con éstos mecanismos, la generación de radicales libres durante la isquemia (309), podría influir en la capacidad del endotelio para secretar ET.

Los niveles mas altos de ET se apreciaron en nuestro estudio, en los periodos de reperfusión tanto precoz como tardía. El incremento del flujo induce un efecto directo sobre la secreción de ET (72), y la reoxigenación incrementa la captación de ET marcada en la membrana de las células cardiacas (310). El motivo exacto de la persistente elevación de la ET tras la liberación del clamp es desconocido.

Se ha descrito que la cirugía mayor eleva por si misma los niveles plasmáticos de ET (253), probablemente en relación con la secreción de ET a partir de lesión endotelial inducida por la manipulación quirúrgica; la secuencia temporal de la elevación de la ET tras el clampaje aórtico en nuestros casos, apunta hacia una influencia directa de la isquemia. Por otra parte, en un estudio en humanos de características similares al nuestro, en el que se midieron los niveles

plasmáticos de ET tras clampaje aórtico e infusión de nifedipina, los valores de ET volvieron a la normalidad al final de la operación (311).

Hemos comprobado igualmente que los pacientes con arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores presentan niveles de ET superiores a los controles, en condiciones basales. Si bien la presencia de diabetes e hipertensión podría influir en éstos resultados, la participación de la ET en esta situación clínica ha sido previamente descrita (250), y podría poseer importancia fisiopatológica.

G.2. Angioplastia coronaria-angina inestable.

En la patogenia de la angina inestable se considera en la actualidad determinante la relación entre la placa de ateroma, la agregación plaquetaria, y la alteración del tono vasomotor (313,314). La ET influye en ésta relación ejerciendo un potente y sostenido efecto vasoconstrictor, que se ha demostrado sobre la circulación coronaria tanto in vivo como in vitro (315,316).

Las arterias con ateromatosis poseen una menor capacidad de relajación, posiblemente en relación con una menor secrección basal de NO (317), con una exagerada sensibilidad a la acción de la ET (318), o por ambas cosas (319). La asociación ateromatosis/exceso de ET podría influir notablemente en la patogenia de la angina inestable (271,320). Los estímulos para la producción de ET son en la actualidad desconocidos en su mayor parte, así como la relevancia de la ET en diferentes situaciones clínicas (321). Sin embargo, la trombina, la presión de rozamiento, el aumento del flujo, y posiblemente la isquemia, sean capaces de estimular su producción in vivo (322). Es posible que el determinante final de la producción de ET sea el daño endotelial. En la enfermedad coronaria aguda, el daño endotelial es una constante (323), posiblemente influida por la isquemia y la formación de trombos de fibrina (324,325). Se ha comprobado que la ET contribuye también a la patogenia del vasoespasmo de la angina variante (angina con coronarias normales, sin placa de ateroma) junto con otros factores como las catecolaminas, el NO, la serotonina, prostaciclina y tromboxano (271).

En nuestros pacientes los valores de basales de ET se encontraban

elevados en las muestras procedentes de la arteria coronaria, arteria femoral y seno coronario; no diferían sin embargo los valores de vena periférica entre los pacientes con angina inestable y controles. Por el hecho conocido de la capacidad del pulmón de extraer la mayor parte de la ET circulante (146), el hallazgo de encontrar valores mas altos en segmentos coronarios (arteria y seno coronarios), que en vena periférica, podría significar que mas cantidad de ET se está produciendo en el territorio coronario, o que menos ET es extraída a través de la circulación pulmonar. Es posible que la mayor producción de ET sea el factor contribuyente a la elevación de sus niveles; Toyooka et al (273) encontraron resultados similares en una serie de pacientes con angina variante y vasoespasmó provocable. Aunque el origen de la ET obtenida en muestras de la arteria coronaria o el seno coronario es claro, resulta especulativo hablar del origen de la ET cuando nos referimos a muestras de vena periférica; la ET que se obtiene de muestras de una vena del antebrazo, ¿representan realmente la ET circulante, o son el resultado de la producción local de ET por parte de la circulación de la extremidad?. Se ha comprobado que en circunstancias que elevan los niveles plasmáticos de ET, existe una amplia distribución de mRNA de ET en múltiples localizaciones, incluido el pulmón y el corazón (165). Por otra parte, se desconoce la función biológica que ejerce ésta producción incrementada de ET. Es posible por tanto, que la valoración de los niveles plasmáticos en vena periférica de ET represente una visión parcial del problema.

Tras la ACTP, los niveles de ET en vena periférica se incrementaron, y fueron significativamente mas elevados que los de los controles. La ACTP es un mecanismo de reperfusión que implica un "daño controlado" de la pared del vaso. La lesión del endotelio en ésta

circunstancia altera su normal mecanismo de control del tono vascular (326); se ha comprobado que tras la ACTP se modifica de manera notable el tono de la microcirculación (327-329), lo que en ocasiones induce marcada vasoconstricción (330). La elevación de los niveles plasmáticos de ET en vena periférica tras la ACTP podría reflejar, por tanto, la lesión endotelial que induce la angioplastia. En seno coronario los niveles de ET disminuyeron tras la ACTP, si bien no alcanzaron significación estadística ($p=0.11$), probablemente por el escaso número de pacientes. Este fenómeno de descenso paradójico es similar al descenso de los valores de ET durante el vasoespasmo inducido por acetilcolina en pacientes con angina variante (273), y podría significar que durante la ACTP se inhibe por algún mecanismo la liberación de ET. Existen tres posibles explicaciones a éste fenómeno: primero, que la ET se secretara en menor cantidad en relación con la oclusión del flujo coronario transitoria que produce el inflado del balón en el interior del vaso; uno de los mecanismos conocidos de liberación de ET es la presión de rozamiento (shear stress) (71), y el aumento del flujo (72). El descenso de la presión de perfusión y el flujo en los segmentos ocluidos por el balón disminuirían la secreción de ET. Las muestras de seno coronario se obtuvieron aproximadamente 3 minutos tras la finalización de la ACTP, quizá en un momento en el que el flujo hiperhémico máximo se encuentra aún reducido, como sucede habitualmente tras la angioplastia (328). Es posible, por tanto, que el descenso de los valores plasmáticos de ET en seno coronario inmediatamente tras la ACTP refleje un efecto flujo-dependiente de disminución de la secreción de ET.

Se ha descrito que tras la ACTP, los valores de ET en seno coronario

se encuentran disminuidos tras la finalización del procedimiento, pero se elevan a los 10 minutos (331). La secuencia de la toma de las muestras en nuestros pacientes fue siempre seno coronario-vena femoral. Quizá muestras más tardías hubieran relegado la elevación descrita tras la ACTP en seno coronario, y el hecho de que las muestras de vena periférica se hayan obtenido después justifique la elevación en vena periférica que nosotros hemos encontrado.

El segundo mecanismo que podría justificar el descenso de la ET es la disminución en el aclaramiento de la ET a través de un territorio vascular contraído; la tasa de aclaramiento de la ET podría estar influenciada por un aumento en la captación de ET por parte de la musculatura lisa vascular adyacente al territorio endotelial lesionado. Se ha demostrado que tras la inyección de ET marcada con ^{125}I , el aclaramiento de ésta es rápida pese a la persistencia de sus efectos biológicos (332), y que los segmentos adyacentes a un territorio isquémico presentan un incremento en el flujo coronario, debido a una mayor capacidad contráctil y a unos niveles incrementados de catecolaminas (273). Las muestras recogidas del seno coronario podrían subestimar la cantidad de ET producida en el territorio lesionado, por estar influenciadas por la totalidad del flujo coronario, que representan la secreción de ET posiblemente incrementada en el área de isquemia, y la secreción quizás normal o alta en el territorio angiográficamente libre de enfermedad.

La tercera explicación para la disminución de la ET podría residir en el tratamiento con nifedipina que recibieron todos los pacientes. Los estudios realizados sobre el efecto de los fármacos antagonistas del calcio (AC) sobre la vasoconstricción inducida por ET ha mostrado resultados contradictorios. Si bien su eficacia clínica en situaciones

en las que está probablemente involucrada la ET, como la angina variante, esta claramente demostrada (333), los estudios in vitro han demostrado que los AC no interfieren de forma relevante en la contracción inducida por ET de segmentos vasculares en cultivo (334-336), aunque si disminuyen los efectos de la ET sobre las arterias coronarias humanas y porcinas (337). En otros estudios, los AC in vitro son capaces de bloquear el incremento del calcio intracelular y la movilización de inositol fosfato en células musculares lisas (338), si bien el mecanismo de elevación del calcio intracelular inducido por ET parece no ser específicamente relacionado con los canales del calcio sensibles a dihidropiridinas (339,340)), y que el antagonismo de los AC frente a la acción de la ET es funcional y no competitivo (341). Sin embargo, la perfusión de nifedipina en humanos es capaz de atenuar la elevación de los niveles plasmáticos y el efecto vasoconstrictor renal de la ET tras el clampaje aórtico infrarrenal; en similares circunstancias (ver protocolo de Endotelina en el clampaje aórtico infrarrenal en ésta misma Tesis), se ha apreciado un aumento constante de los niveles plasmáticos de ET sin infusión de nifedipina. En todo caso, el número escaso de pacientes impide obtener deducciones concluyentes. En nuestro estudio se produjo una alta incidencia de reestenosis (57%), superior a la media habitual entre el 16-45% (342,343); éstas diferencias con respecto al global de pacientes con angina inestable, y otras posibles diferencias no detectadas en cuanto a su enfermedad coronaria o factores de riesgo, implica que sean necesarios posteriores estudios para aclarar el papel de la ET en la angina inestable, y su posible influencia en la reestenosis tras ACTP.

G.3. Infarto agudo de miocardio.

Hemos descrito niveles plasmáticos aumentados de ET en las primeras 24 horas de evolución del infarto de miocardio (figura C2). La elevación de la ET en las primeras horas del IAM es un hecho descrito previamente (267,268,344-346). En estudios en animales con IAM producido por la ligadura de la arteria coronaria, se han descrito niveles plasmáticos elevados de ET (347,348), y se ha comprobado que la administración de anticuerpos monoclonales anti-ET disminuye el área de infarto (271). No se conoce con precisión el mecanismo que induce la liberación de ET, aunque la isquemia miocárdica y la lesión endotelial asociada, probablemente sean los factores determinantes (349). En estudios en los que se produjo isquemia mediante la ligadura de la arteria coronaria (270), o la aplicación directa de un trombo en una arteria coronaria principal (350), no se apreció elevación significativa de la ET, excepto si tras éste periodo de isquemia seguía otro de reperfusión. La reperfusión en éstos casos se indujo mediante la liberación de la obstrucción mecánica (retirada de la ligadura), o por fibrinólisis con uroquinasa, respectivamente. Se ha sugerido, por tanto, que factores aparte de la isquemia, influyen en la elevación de la ET tras el IAM. La presión de rozamiento (24), y la sobrecarga de calcio intracelular (29), junto con el efecto de la trombina, podrían ser otros factores implicados en ésta elevación de ET. La isquemia miocárdica, por otra parte, induce cambios a nivel intracelular como alteraciones del metabolismo intermediario y fosforilación oxidativa (351), anomalías en metabolismo lipídico (352) e hidroelectrolítico (353), cuya relación con la síntesis de ET no ha sido establecida. La isquemia y la

reperfusión aumentan la producción de radicales libres de oxígeno (354), que ejercen un efecto tóxico sobre el endotelio (355), y quizás sean capaces de influir en la producción de ET. Durante la reperfusión se ha descrito aumento en el tono de la microvasculatura de causa no precisada (356-358), reversible con el AC diltiazem (356); aunque hasta la actualidad se consideraba que, al igual que en relación con la aparición de arritmias post-reperfusión, el mecanismo de producción de éste fenómeno de vasoconstricción se relacionaba con el aumento de la concentración de calcio intracelular y su capacidad de estimular receptores alfaadrenérgicos (359), es posible que sea influido notablemente por la ET, habida cuenta su importancia en el tono coronario y la contractilidad miocárdica (360).

Una explicación a la elevación de los niveles plasmáticos de ET tras la fibrinólisis es la existencia de un fenómeno de lavado o "wash-out" (270). Tras el estímulo capaz de incrementar la producción local de ET, la reperfusión de éste área "lavaría" ésta ET producida en exceso, y aumentaría sus niveles plasmáticos. Sin embargo, en un estudio se ha descrito discordancia entre los niveles plasmáticos de ET y la cantidad total de ET producida localmente, que se mantiene elevada pese a la normalización de los niveles plasmáticos (347). Es posible que el rápido aclaramiento pulmonar de la ET justifique la discordancia entre niveles en tejido y en plasma.

Por nuestros resultados se puede comprobar que el tratamiento mediante fibrinólisis eleva notablemente los valores de ET (figura C5). Esta elevación refleja la reperfusión del área isquémica en relación con la liberación de la obstrucción trombótica coronaria.

Se ha descrito que la elevación de los niveles plasmáticos de ET dos veces por encima del valor normal se relaciona con la aparición de

efectos sistémicos, en concreto vasoconstricción de predominio renal, con disminución de la frecuencia y gasto cardíacos, sin efecto sobre la circulación coronaria y la tensión arterial (96). Los niveles locales de ET es posible que sean proporcionalmente muy superiores a los obtenidos en muestras plasmáticas, por el efecto del aclaramiento pulmonar (146). No está establecido si la elevación de los niveles plasmáticos de ET tras el IAM se asocia con efectos biológicos diferentes de la extensión del área de infarto, pero en relación con el efecto arritmogénico de la ET (361), no relacionado enteramente con la isquemia (362), se puede especular con su contribución al desarrollo de arritmias por reperfusión (363).

En trabajos previos de nuestro grupo (364), habíamos comprobado una variación relacionada con el tiempo de los niveles plasmáticos de ANF; nuestros resultados actuales ratifican aquellos hallazgos (figura C3). La inexistencia de una correlación positiva entre ET y ANF, sugiere que, al menos en nuestros casos de IAM, no se produce una elevación compensatoria de los niveles de ANF frente a los de ET. Se ha demostrado un efecto opuesto de la ET y ANF en cuanto al control de la presión arterial y la natriuresis (188,366). Su efecto antagónico y de retroalimentación ("feed-back") positivo representa un aspecto importante del control circulatorio y de la homeostasis de los líquidos corporales. La ET estimula la producción de ANF in vivo (189,367) e in vitro, por un mecanismo no relacionado con la distensión auricular (189,368,369); la administración de ANF atenúa el efecto presor de la ET (188,367), minimiza el efecto deletéreo de la ET sobre la circulación renal (370,371), e inhibe la producción de ET (366). En situaciones en las que se produzca una elevada cantidad de ET, la falta

de compensación por ANF inducirá una mas clara expresión de los efectos biológicos de aquella (188).

No se conoce con precisión el mecanismo que influye en la variación temporal de los niveles plasmáticos de ANF tras el IAM. Según la hipótesis vigente (372,469), en relación con el descenso del gasto cardiaco que produce la disminución de la contractilidad miocárdica por el IAM, se produciría hipoperfusión renal, que estimularía la actividad del sistema renina-angiotensina; ésto induce retención de agua y sal, aumento del volumen plasmático y elevación de la presión auricular. El aumento en la presión auricular estimularía la producción de ANF, que por medio de su efecto natriurético, aumentaría la excrección de sodio y disminuiría el volumen plasmático. Esto a su vez disminuiría la presión en la aurícula derecha, y haría descender la producción de ANF. Si se considera que el ANF es una hormona sólo dependiente del volumen (373), es posible que se obtenga sólo una visión simplista del problema. Otros estímulos para la secrección de ANF son la frecuencia cardiaca (374,375), el estímulo del sistema nervioso simpático (376), y otros factores como los agentes colinérgicos, los ésteres de phorbol, ionóforo de calcio y ET (377). Si bien en nuestro estudio no disponemos de datos sobre el volumen plasmático ni la presión venosa central (no se consideró ético la colocación de un catéter venoso central si no estaba indicado clínicamente), de forma constante se apreció una elevación de la concentración de renina activa, que mostró una correlación positiva con significación estadística frente a ET (figura C8). El estímulo del sistema renina angiotensina aldosterona es otro factor involucrado en la producción de ANF (378). La incapacidad, por tanto, de elevar los niveles plasmáticos de ANF en ésta situación clínica, en la que se encuentran incrementadas la actividad de dos

sistemas presores, ET y CRA, podría considerarse como patológica, cuyo resultado es la tendencia hacia la vasoconstricción y mantenimiento de la isquemia.

G.4. Accidente vascular cerebral isquémico.

Hemos descrito elevación de los niveles plasmáticos de ET en pacientes con ACV isquémico; no existen referencias previas en la Literatura en éste campo. La ET es un péptido con intensa acción vasoconstrictora, cuyo origen fundamental es el endotelio vascular, que se produce posiblemente en condiciones de lesión de éste (24).

La importancia de la ET como regulador del tono vascular cerebral y su papel como neuropéptido han sido ampliamente demostrados (207,211,215). La ET ejerce un potente efecto vasoconstrictor de las arterias cerebrales, comprobado tanto en estudios in vivo (121-123), como in vitro (209). Sin embargo, en otros trabajos se ha apreciado que el efecto presor sobre la circulación cerebral de la ET se atenúa de manera significativa cuando la administración se produce por vía intravenosa (383), que el efecto de la ET sobre la circulación cerebral es menos potente que sobre otros lechos vasculares (384), y que el efecto vasoconstrictor sobre las arterias craneales se produce fundamentalmente tras la administración intratecal de ET, y no después de la administración a través de la arteria vertebral (385). Estas diferencias probablemente se deriven de la influencia de la anestesia sobre los modelos animales de reactividad vascular, ya que se ha comprobado que tanto el tiopental, fenobarbital y ketamina atenúan la respuesta vasoconstrictora de la ET (208). La administración continúa de ET a través de una bomba de infusión implantada en el espacio subaracnoideo induce una intensa vasoconstricción de las arterias craneales (225); igualmente, tras la aplicación de ET en la microcirculación a través de microinyecciones (1-300 fmol) en el parénquima cerebral, se aprecia una reducción dosis-dependiente de la

perfusión cortical (211).

Existen múltiples receptores para ET1 y ET3 en el sistema nervioso central (200,386,387). Se ha comprobado que la ET induce en células del SNC un efecto de aumento variable del calcio intracelular (197,388), que se atenúa con AC; el efecto vasoconstrictor de la ET se atenúa igualmente con inhibidores de la enzima ciclooxigenasa y con antagonistas del tromboxano (209).

Es posible que la ET se produzca en exceso en el área neuronal y endotelial lesionada por la isquemia, y que ésto induzca una elevación de los valores plasmáticos. El papel de la ET como marcador de daño tisular inespecífico ha sido sugerido tras la demostración de la elevación de sus niveles plasmáticos tras cirugía mayor (253), o en pacientes traumatizados (389). Contrasta con ésto, sin embargo, la prolongada duración de sus efectos biológicos y su marcada influencia sobre el tono vasomotor. Hasta la fecha no es posible explicar satisfactoriamente su papel en el contexto de un ACV isquémico.

En todo caso, de nuestros resultados se puede deducir que la ET es un marcador pronóstico de la severidad del ACV; como se expresa en la figura D9, los niveles plasmáticos de ET se encontraban significativamente elevados en los pacientes que evolucionaron desfavorablemente. Los pacientes que sufrían mas daño neurológico presentaban niveles mas elevados de ET (figura D2). La elevación de la ET se mantiene durante la primera semana de evolución del ACV, aunque probablemente por influencia del escaso número de pacientes ésto se adscribe sólo al grupo de pacientes que recibieron Nicardipina. Otro factor destacable que influye en la evolución de nuestros pacientes es el nivel plasmático de ANF. Pudimos apreciar una correlación

significativa positiva entre el valor de ANF al ingreso y la mejoría global del daño neurológico (fig D3); la TAD se relacionó de forma inversa con la mejoría (fig D4). La incapacidad para secretar sustancias vasodilatadoras tras la elevación de ET se asocia con el mantenimiento de la isquemia y la lesión celular (390); la relación entre ANF y ET es especialmente relevante por su marcado efecto antagónico in vivo, ya que el ANF atenúa notablemente el efecto presor de la ET cuando se infunde ésta por vía iv, y el pretratamiento con Ac anti-ANF exagera la respuesta presora a la administración de ET (188). Se podría suponer que, en aquellos pacientes con suficiente capacidad para secretar ANF u otras sustancias vasodilatadoras (391), se podría atenuar el efecto vasoconstrictor de la ET, y ésto se traduciría clínicamente por una menor lesión neurológica y una recuperación precoz. Aunque no existió correlación entre los valores de TAD y ANF, se puede especular igualmente con el hecho de que un menor tono vascular en éstos pacientes pudiera deberse a un exceso de actividad vasodilatadora, y que ésto se asocia con mejor pronóstico. Sin embargo, son múltiples los factores que se asocian con el mantenimiento de la TA en pacientes con ACV, y probablemente sería erróneo simplificarlo a una proporción inadecuada entre vasodilatación y constricción. Se ha descrito, por otra parte, que en éstos pacientes el mantenimiento de adecuados niveles de TA por si mismo es capaz de ejercer una influencia beneficiosa sobre el pronóstico (392).

La influencia de los antagonistas del calcio (AC) sobre la acción vasoconstrictora de la ET es motivo de controversia (393). En algunos territorios vasculares, como el coronario (315), renal (175), o cerebral (208), es posible demostrar una atenuación de los efectos de la ET, cuando se analiza la respuesta vasoconstrictora in vivo o vitro.

La idea original de Yanagisawa et al (24), de que la ET se comportaba como un agonista endógeno de los canales del calcio dihidropiridín-sensibles, sin embargo, se ha visto modificada por la abundante evidencia experimental de la importancia del calcio extracelular pero el escaso o nulo efecto de los AC para abolir eficazmente la acción constrictora de la ET (28). En nuestros pacientes la administración de nicardipina no modificó los niveles plasmáticos de ET, aunque si ejerció una notable influencia en el pronóstico; probablemente se trate de un error inducido por la inclusión de pacientes en uno u otro grupo, en relación con una mayor frecuencia de exitus en el que no recibió nicardipina, influida por el escaso número de pacientes. Se ha demostrado el efecto beneficioso de los AC cuando se utilizan precozmente en el ACV (394-396), pero son necesarios posteriores estudios que confirmen éstos hallazgos preliminares.

G.5. Sepsis-Endotelina.

Los resultados de éste estudio muestran que los niveles plasmáticos de ET se encuentran significativamente elevados en pacientes con síndrome séptico o shock séptico, en comparación con los valores encontrados en voluntarios sanos. Pittet (295) ha descrito elevación de ET en 11 pacientes en las primeras 24 horas del desarrollo de síndrome séptico, apreciando una correlación positiva entre ésta y la gravedad clínica determinada por la puntuación en la escala APACHE 2, y una correlación negativa con respecto al índice cardiaco.

Weitzberg (250) ha descrito igualmente elevación de la ET en 6 pacientes con síndrome séptico, siendo especialmente marcada en aquellos pacientes que presentaban fracaso renal. Aunque no existe una explicación definitiva que justifique la elevación de los niveles plasmáticos de ET, se considera que el daño endotelial en el curso de la sepsis es el mecanismo responsable de ésta (401). La alteración del tono y la permeabilidad vascular durante la sepsis se relacionan con el daño endotelial (402,403).

Las endotoxinas producidas por algunas bacterias gram negativas, también la enterotoxina, la toxina 1 del síndrome del shock tóxico, los productos de la pared celular de bacterias gram positivas u hongos, o antígenos virales (404), pueden iniciar la cascada de la sepsis (405). Se ha comprobado que la endotoxina es capaz de estimular la producción de ET tanto in vivo como in vitro (70). Tras la presencia en la circulación de endotoxina, se considera que ésta inicia una serie de reacciones biológicas entre las que destaca la producción de TNF, interleukina 1, interleukina 6, interleukina 8, y PAF (factor activador

plaquetario), por parte de fagocitos mononucleares y otras células, incluidas las endoteliales (406). Junto con ello, se activa la cascada de la coagulación (407) y el sistema del complemento (408). Tras la producción de TNF, interleukina 1 y PAF, el ácido araquidónico se metaboliza hacia la formación de leucotrienos, tromboxano, prostaglandina E₂, y prostaciclina. La interleukina 1 y la interleukina 6 activan a los linfocitos T para producir interferon gamma, interleukina 2, interleukina 4 y factor estimulador de las colonias de granulocitos-monocitos (288,401,409,410). Todos éstos factores ejercen efectos directos sobre el endotelio vascular. La endotoxina (411), TNF (412), PAF (413), leucotrienos (414) y tromboxano A₂ (415), incrementan la permeabilidad vascular a través de un efecto directo sobre el endotelio. La activación de la cascada del complemento en el curso de la sepsis induce alteraciones en la función vascular (416), y provoca activación de los neutrófilos. Los neutrófilos ejercen un efecto tóxico sobre el endotelio a través de la degranulación de enzimas lisosomales (417) y mediante la liberación de radicales libres de oxígeno (418).

Se ha comprobado que parte de los mediadores conocidos de la sepsis estimulan la secreción in vitro de ET; la interleukina 1 añadida al medio de cultivo de células endoteliales estimula la producción de ET de manera dosis y tiempo-dependiente (287). Los leucocitos polimorfonucleares poseen capacidad de convertir big-ET a ET-1, así como degradar ET (290). La liberación de ET inducida in vivo tras la administración de endotoxina se correlaciona con el grado de vasoconstricción renal y esplénica (419). El endotelio vascular podría secretar ET debido a la presencia de múltiples estímulos en el contexto de la sepsis. El posible papel de la ET en el contexto de la sepsis se

expresa en la figura E7.

El papel del óxido nítrico, con funciones antagónicas a las de la ET, parece igualmente relevante en el mantenimiento del tono vascular en la sepsis (420-422); es posible que la proporción entre NO y ET en el seno de la microvasculatura sea importante para el mantenimiento de la presión arterial en la sepsis (423).

Hemos demostrado igualmente una elevación de los niveles plasmáticos de ANF en pacientes con sepsis, que se correlaciona positivamente con los niveles de ET. El ANF es una hormona involucrada fundamentalmente en la regulación del volumen plasmático (424), cuyos estímulos principales son la distensión auricular y la frecuencia cardiaca. En nuestros pacientes no pudimos apreciar una relación entre la presión arterial, hematocrito, creatinina plasmática, ni la frecuencia cardiaca con los niveles de ANF. Existe suficiente evidencia en la actualidad como para considerar que el ANF ejerce una función antagónica a la ET (188,366); el aumento en la secreción de ET por parte de un endotelio lesionado en el curso de la sepsis podría por tanto, estimular la liberación de ANF. De nuestros resultados no se puede deducir, sin embargo, que otros factores involucrados en el curso de la sepsis pudieran igualmente influir en los niveles de ANF, como la presión en la aurícula derecha o el estímulo alfa y beta adrenérgico (377).

No existe explicación para la diferencia entre los niveles plasmáticos de ANF entre aquellos pacientes con sepsis inducida por gérmenes gram negativos; si bien la endotoxina, y en concreto su porción lipídica el péptido A, es un producto de la pared celular exclusiva de los gérmenes gram negativos, es considerado el factor inicial en la cascada de la sepsis (405). Se ha comprobado que en aquellos pacientes en situación de shock séptico en los que se detecta con mas frecuencia endotoxemia,

existe una mayor frecuencia de fracaso multiorgánico, disminución de las resistencias vasculares periféricas y depresión de la contractilidad miocárdica (425,426). Cabría suponer, por tanto, una relación entre la presencia de gérmenes gram negativos, endotoxemia, alteración de la regulación del tono vascular y ANF.

La elevación de los niveles de C3d, como índice de activación del sistema de complemento, ha sido descrita en el contexto de la sepsis (427), y se ha relacionado la magnitud de su elevación con la mortalidad (408,428), los niveles de lactato e interleukina 6 (427), y con el grado de alteración de la permeabilidad vascular y la presión arterial (429). El sistema del complemento se ve activado en la sepsis a partir de la vía clásica (C1, C4 y C2), por medio del reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo que se unen al factor C1q, y a través de la vía alternativa (factores B, D, y C3) mediante el reconocimiento de bacterias y productos de su pared celular, o mediante complejos inmunes compuestos por IgA o IgD (430). Tras la generación de C3a y C5a (anafilotoxinas), el sistema del complemento media la iniciación del daño de membrana celular mediante sus productos finales C5-C9, y se producen una serie de cambios humorales entre los que se incluyen vasodilatación, incremento de la permeabilidad capilar, aumento de la agregación plaquetaria, y activación de los neutrófilos, con el consiguiente daño endotelial (431).

En nuestros pacientes pudimos apreciar una marcada elevación de los niveles de C3d, que refleja activación del sistema del complemento. Aunque no poseían influencia pronóstica, ni existió ninguna correlación entre los niveles de C3d y otros parámetros analizados, es posible que la activación del sistema del complemento influyera en el daño endotelial y en la elevación de los niveles plasmáticos de ET.

H. Resumen de los estudios clínicos.

H.1. Clampaje aórtico infrarrenal.

Los niveles plasmáticos de ET se encontraron elevados en una serie de 13 pacientes con arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores. Durante la cirugía para la colocación de una prótesis aortobifemoral, se realizó clampaje infrarrenal de la arteria aorta. Los niveles plasmáticos de ET se mantuvieron elevados durante la isquemia, y aumentaron aun mas tras 5 y 30 minutos de liberación del clamp. Se concluye que: 1. Los pacientes con arteriosclerosis obliterante presentan valores elevados de ET en condiciones basales. 2. El clampaje aórtico infrarrenal induce una elevación significativa de los niveles plasmáticos de ET. 3. La reperfusión tras la liberación del clamp se asocia con una elevación sostenida de los valores de ET.

H.2. Angina inestable-ACTP.

Se han estudiado a 7 pacientes con angina inestable por enfermedad coronaria de un vaso, sometidos a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP). Los niveles plasmáticos de ET se encontraban elevados con respecto a controles sanos, antes de la ACTP, en las muestras obtenidas de arteria coronaria, seno coronario y arteria femoral; los niveles de ET en vena periférica y seno coronario se elevaron significativamente tras la realización de la ACTP.

La endotelina plasmática se encuentra elevada en la angina inestable, y el incremento de sus niveles plasmáticos tras ACTP podría

relacionarse con el desarrollo de reestenosis.

H.3. Infarto de miocardio.

Los niveles plasmáticos de ET se encontraron elevados durante las primeras 24 horas de evolución en una serie de 10 pacientes con infarto de miocardio, que no presentaron insuficiencia cardiaca. Se encontraron diferencias significativas con respecto a controles en las muestras obtenidas al ingreso (con menos de 12 horas de evolución), y a las 4, 8 y 24 horas de éste. Los niveles plasmáticos de ANF mostraron una evolución tiempo-dependiente, con valores elevados al ingreso, normalizándose a las 4 y 8 horas, para volver a elevarse a las 24 horas de éste. Se encontraron valores de renina superiores a los controles durante las 24 primeras horas de evolución del IAM.

En los pacientes a los que se realizó trombolisis con fibrinolíticos, se comprobó una elevación notable de los valores plasmáticos de ET a las 24 horas del ingreso.

H.4. Accidente cerebrovascular isquémico.

Se han determinado los niveles plasmáticos de ET, ANF y CRA en una serie de 17 pacientes diagnosticados de ACV isquémico, que fueron seguidos durante siete días tras la aparición de éste. El ACV fue diagnosticado en base a la aparición de síntomas y signos de lesión neurológica establecida, con un TAC craneal sin evidencia de hemorragia o tumor. Se analizó el grado de daño neurológico mediante la puntuación en la escala de Mathew, y la evolución de la severidad se cuantificó mediante el cálculo del índice de mejoría relativa. Los niveles

plasmáticos de ET se encontraban elevados al ingreso, y se mantuvieron elevados en las muestras de sangre obtenidas al tercer y séptimo día de su evolución. Se encontró una relación entre la puntuación en la escala de Mathew, cuando ésta era inferior a los 40 puntos, y niveles plasmáticos mas elevados de ET. Los pacientes que evolucionaron peor presentaban igualmente niveles plasmáticos mas elevados de ET. Los niveles plasmáticos de ANF se encontraban elevados al ingreso, y se pudo apreciar una correlación positiva entre la mejoría clínica al séptimo día y los niveles de ANF al ingreso. No se apreció variación significativa de los niveles de renina. 7 Pacientes recibieron de forma aleatoria 120 mg/día de nicardipina, apreciándose una mejoría significativa de su lesión neurológica al séptimo día, influida probablemente por un menor número de exitus en éste grupo. No se apreciaron diferencias en los niveles plasmáticos de ET entre los pacientes que recibieron o no nicardipina.

H.5. Sepsis.

Hemos analizado los niveles plasmáticos de ET, ANF y C3d en una serie de 11 pacientes con sepsis o shock séptico. Se ha comprobado que en esta situación clínica se encuentran elevados los niveles de ET, sin que ésto se relacione con la mortalidad, gravedad clínica, insuficiencia renal, ni ningún otro parámetro de los analizados, y probablemente refleje lesión endotelial en relación con la sepsis. Los niveles plasmáticos de ANF se encuentran igualmente elevados, apreciándose una correlación lineal positiva con los niveles plasmáticos de ET. Los niveles de C3d se encuentran igualmente elevados en esta serie de pacientes, sin poseer influencia pronóstica.

I. Conclusiones.

1. La endotelina-1 es un péptido con marcada acción vasoconstrictora, secretada fundamentalmente por el endotelio vascular, cuyos valores plasmáticos en individuos sanos son de 0.54 ± 0.51 pg/ml.
2. En pacientes con arteriosclerosis sistémica los niveles plasmáticos de ET son superiores a los valores de los sujetos sanos.
3. La isquemia inducida por el clampaje aórtico infrarrenal en el contexto de la colocación de una prótesis vascular aorto bifemoral, induce elevación de los niveles plasmáticos de ET, que se mantiene tras la reperfusión producida por la apertura del clamp.
4. En pacientes con angina inestable por enfermedad coronaria de un sólo vaso, la realización de ACTP eleva los niveles plasmáticos de ET en seno coronario y sangre periférica.
5. Los niveles plasmáticos de ET se encuentran elevados en las primeras 24 horas de evolución del infarto de miocardio no complicado.
6. Los pacientes con infarto de miocardio tratados con fibrinólisis mediante estreptoquinasa o r-TPA, poseen niveles plasmáticos de ET mas elevados que los tratados de forma convencional.
7. Los niveles de renina plasmática se encuentran elevados durante las primeras 24 horas de evolución del infarto de miocardio.

8. Los niveles de ANF muestran una variación tiempo-dependiente en el infarto de miocardio, encontrándose elevados al ingreso y a las 24 horas de evolución.
9. Los niveles plasmáticos de ET se encuentran elevados en pacientes con accidente vascular cerebral de naturaleza isquémica, y se mantienen elevados durante la primera semana tras la aparición de éste.
10. Los niveles plasmáticos de ET poseen valor como marcador del pronóstico y severidad del accidente cerebral isquémico.
11. La nicardipina no produce variación en los niveles plasmáticos de ET en pacientes que han sufrido un accidente isquémico cerebral.
12. Los niveles plasmáticos de ANF y renina se encuentran elevados durante los primeros siete días de evolución del accidente vascular cerebral isquémico.
13. Los niveles de ANF en las primeras horas de evolución tienen influencia pronóstica en pacientes con accidente vascular cerebral isquémico.
14. Los niveles plasmáticos de ET se encuentran elevados en pacientes con síndrome séptico o shock séptico.
15. Los niveles de ANF se encuentran elevados en pacientes con sepsis o shock séptico, correlacionándose de manera positiva con los niveles de ET.

16. En pacientes con sepsis o shock séptico se produce activación del sistema del complemento, determinado mediante la elevación de los niveles plasmáticos de C3d.

BIBLIOGRAFIA

1. Jiménez Díaz C, de la Barreda P, Molina F, y Alcalá R. La secreción interna de la pared arterial en la regulación de la presión sanguínea. Comunicación al I Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna, Abril 1952, Madrid.
2. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxidase to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263:663-665.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
4. Vanhoutte PM, ed. Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. New York: Raven Press, 1988: 1-572.
5. Vanhoutte PM, ed. The endothelium: relaxing and contracting factors. Clifton, NJ: Humana Press 1988; 1-552.
6. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, et al. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984; 308: 645-647.
7. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
8. Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2495-2501.
9. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. NO: The endogenous regulator of vascular tone. In Warren JB, ed. *The endothelium: an introduction to current research*. Wiley-Liss, New York. 1990:1-6
10. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:358-362.
11. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, et al. A specific inhibitor of nitric oxide formation from l-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 418-424.
12. Amezcua JL, de Souza BM, Palmer RMJ, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit isolated heart. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 1119-1124.
13. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of the endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci*

USA 1989; 86: 3375-3378.

14. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, et al. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990; 15: 486-492.

15. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2: 997-1000.

16. Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 1988; 319: 462-467.

17. Vanhoutte PM. The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med* 1988; 319: 512-513.

18. Harrison DG. From isolated vessels to catheterization laboratory. *Circulation* 1989; 80:703-706.

19. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364: 45-56.

20. Rubanyi GM. Endothelium-derived vasoconstrictor factors. In Ryan US., ed. *Endothelial cells*. Vol 3. Boca Raton, Fla: CRC Press 1988; 61-74.

21. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, et al. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 307-320.

22. Anggard EE, Botting RM, Vane JR. Endothelium-derived vasoconstricting factors. In Warren JB, ed. *The endothelium: an introduction to current research*. Wiley-Liss, New York, 1990; 7-20.

23. Vanhoutte PM, Katusic ZS. Endothelium-derived constricting factor, endothelin and/or superoxide anion?. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 229-230.

24. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.

25. Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, et al. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released by endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 339-343.

26. Inoue A, M, Kimura S, et al. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863-2867.

27. Kosaka T, Suzuki N, Matsumoto H, et al. Synthesis of vasoconstrictor peptide endothelin in kidney cells. *FEBS Lett* 1989; 249: 42-46.

28. Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium derived peptide. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1877-1883.
29. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 374-378.
30. Galron R, Kloog Y, Bdolah A, et al. Functional endothelin/sarafotoxin receptors in rat heart myocytes: structure-activity relationships and receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 163: 936-943.
31. Takasaki C, Yanagisawa M, Kimura S, et al. Similarity of endothelin to snake venom toxin. *Nature* 1988; 335: 303.
32. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, et al. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988; 242: 268-270.
33. Fleminger G, Bousso-Mittler D, Bdolah D, et al. Immunological and structural characterization of sarafotoxin- endothelin family of peptides. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 1317-1323.
34. Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem* 1989; 264: 10851-10857.
35. Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, et al. Analysis of endothelin related peptides in culture supernatant of porcine aortic endothelial cells: evidence for biosynthetic pathway of endothelin-1. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 1287-1294.
36. Wu-Wong JR, Budzik GP, Devine EM, et al. Characterization of endothelin converting enzyme in rat lung. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 171: 1291-1296.
37. Ikegawa R, Matsumura Y, Takaoka M, et al. Evidence for pepstatin-sensitive conversion of porcine big endothelin-1 to endothelin-1 by the endothelial cell extract. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 167: 860-866.
38. Emori T, Hirata Y, Ohta K, et al. Concomitant secretion of big endothelin and its C-terminal fragment from human and bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 217-223.
39. Shichiri M, Hirata Y, Emori T, et al. Secretion of endothelin and related peptides from renal epithelial cell lines. *FEBS Lett* 1989; 253: 203-206.
40. McMahon EG, Fok KM, Moore WM, et al. In vitro and in vivo activity of chymotrypsin-activated big endothelin-1. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 406-413.
41. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, et al. Conversion of big ET-1 to 21-residue ET-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big ET-1. *J Cardiovasc*

Pharm 1989; 13 (Suppl.5):S5-S7.

42. Takada J, Okada K, Ikenaga T, et al. Phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme in the cytosol of cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1991; 176: 860-865.

43. Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, et al. Purification and characterization of putative endothelin converting enzyme in bovine adrenal medulla: evidence for a cathepsin D-like enzyme. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 168: 1230-1236.

44. Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, et al. Characterization of endothelin converting enzyme activities in soluble fraction of bovine cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 169: 1138-1144.

45. Ohnaka K, Takayanagi R, Yamauchi T, et al. Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 168: 1128-1136.

46. Angaard E, Galton S, Rae G, et al. The fate of radio-iodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S43-S49.

47. MacCumber MW, Ross Ca, Glaser BM, et al. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7285-7289.

48. Martin ER, Marsden PA, Brenner BM, et al. Identification and characterization of endothelin binding sites in rat renal papillary and glomerular membranes. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 130-137.

49. Marsden PA, Danthuluri NR, Brenner BM, et al. Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol triphosphate and calcium mobilization. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 158: 86-93.

50. Cozza EN, Gómez Sánchez CE, Foecking MF, et al. Endothelin binding to cultured calf adrenal glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J Clin Invest* 1989; 84: 1032-1035.

51. Moody CJ, Dashwood MR, Sykes M, et al. Functional and autoradiographic evidence for endothelin-1 receptors on human and rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1990; 67: 764-769.

52. Nakajo S, Sugiura M, Snajdar RM, et al. Solubilization and identification of human placental endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 164: 205-211.

53. Bousso-Mittler D, Kloog Y, Wollberg Z, et al. Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 952-957.

53. Power RF, Wharton J, Zhao Y, et al. Autoradiographic localization of endothelin-1 binding sites in the cardiovascular and respiratory systems. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S50-S56.

54. Takuwa Y, Masaki T, Yamashita K. The effects of the endothelin family peptides on cultured osteoblastic cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 170: 998-1005.
55. Davenport AP, Nuñez DJ, Hall JA, et al. Autoradiographic localization of binding sites for porcine 125-I-endothelin 1 in human, pigs, and rats: functional relevance in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S166-S170.
57. Shinmi O, Kimura S, Yoshizawa T, et al. Presence of endothelin-1 in porcine spinal cord: isolation and sequence determination. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 340-346.
58. Brenner BM, Troy JL, Ballerman BJ. Endothelium-dependent vascular responses; mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 1989; 84: 1373-1378.
59. Vane JR, Angaard E, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
60. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox C, et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exper Med* 1990; 172: 1741-1748.
61. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, et al. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1989; 238: 249-252.
62. Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, et al. A novel vasoactive peptide, endothelin, stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1989; 264: 7856-7861.
63. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cell lines. *J Clin Invest* 1991; 87: 1867-1871.
64. Hamblin TJ. Endothelins. Chemical messengers with many functions. *BMJ* 1990; 301: 568.
65. Clozel M, Fischli W. Human cultured endothelial cells do secrete endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S229-S231.
66. Leak LV. Electron microscopic structure of the mammalian vascular wall. In *Electron Microscopy in Human Medicine*. Vol 5. Johansen JV, ed. New York; MacGraw-Hill International Book Company, 1980. 94-140.
67. O'Brien RF, Robbins RJ, McMurty IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 1987; 132: 263-270.
68. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al. Transforming growth factor beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 159: 1435-1440.
69. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, et al. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1989; 165: 333-334.

70. Sugiura M, Inagami T, Kon V. Endotoxin stimulates endothelin release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 1220-1227.
71. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, et al. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 859-864.
72. Milner P, Bodin P, Loesch A, et al. Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 170: 649-656.
73. Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, et al. Evidence for ET1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 169: 973-977.
74. Yamada K, Goto A, Hui C, et al. Endogenous digitalis-like factor as a stimulator of endothelin secretion from endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 172: 178-183.
75. Badr K, Munger M, Sugiura R, et al. High and low affinity binding sites for endothelin on cultured rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 776-781.
76. Arai H, Hori S, Aramori I, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732.
77. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa I, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732-735.
78. Bolger T, Liard F, Krogsrud R, et al. Tissue specificity of endothelin binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16: 367-375.
79. Watanabe H, Miyazaki H, Kondoh M, et al. Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 1252-1259.
80. Sugiura M, Snajdar RM, Schwartzberg M, et al. Identification of two types of specific endothelin receptors in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 1396-1401.
81. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, et al. Presence of non-selective type of endothelin receptors and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett* 1991; 282: 103-106.
82. Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, et al. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 653-658.
83. Resinck T, Scott-Burden T, Buhler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 157: 1360-1368.

84. Kasuya Y, Takuwa Y, Yanagisawa M, et al. Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 1049-1055.
85. Onishi A, Yamaguchi K, Kusuhara M, et al. Mobilization of intracellular calcium by endothelin in swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 489-495.
86. Miasiro N, Yamamoto H, Kanaide H, et al. Does endothelin mobilize calcium from intracellular calcium stores in rat aortic vascular smooth muscle cells in primary culture?. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 156: 312-317.
87. Meyer-Lenhert H, Wanning C, Predel HG, et al. Effects of endothelin on sodium transport mechanisms: potential role in cellular calcium mobilization. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 163: 458-465.
88. Bialecki RA, Izzo N, Colucci WS. Endothelin-1 increases intracellular calcium mobilization but not calcium uptake in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 164: 474-479.
89. Iijima K, Lin L, Nasjletti a, et al. Intracellular ramification of endothelin signal. *Am J Physiol* 1991; 260: C982-C992.
90. Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, et al. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 154: 868-875.
91. Kozuka M, Ito T, Hirose S, et al. Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 159: 317-323.
92. Renterghem CV, Vigne P, Barhanin J, et al. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 157: 977-985.
93. Sunako M, Kawahara Y, Kariya KI, et al. Endothelin-induced biphasic formation of 1,2 diacylglycerol in cultured rabbit vascular smooth muscle cells-mass analysis with radioenzymatic assay. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 160: 744-750.
94. Lee TS, Chao T, Hu KQ, et al. Endothelin stimulates a sustained 1,2 diacylglycerol increase and protein kinase C activation in bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 381-386.
95. Renterghem CV, Vigne P, Barhanin J, et al. Molecular mechanism of endothelin-1 action on aortic cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S186-S187.
96. Ando K, Hirata Y, Schichiri M, et al. Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett* 1989; 245: 164-166.

97. Lerman A, Hildebrand FL, Aarhus LL, et al. Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation* 1991; 83: 1808-1814.
98. Heublein DM, Miller W, Caverro PG, et al. Presence of endothelin in human and canine plasma (abstract). *Am J Hypertens* 1989; 4: 211A.
99. Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, et al. A sensitive sandwich-enzyme radioimmunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods* 1989; 118: 245-250.
100. Harter E, Woloszczuk W. Radioimmunoassay of endothelin. *Lancet* 1989; 2: 909.
101. Peninsula Laboratories, Merseyside, UK. Specifications about 125I-ET1 radioimmunoassay kit, 1991.
102. Nakajima K, Kubo S, Kumayage SI, et al. Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 163: 424-429.
103. Masaki T. The discovery, present state and future prospects of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S1-S4.
104. Miller WL, Redfield MM, Burnett JC. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest* 1989; 83: 317-320.
105. Pohl U, Busse R. Differential vascular sensitivity to lumenally and adventitially applied endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S188-S190.
106. Walder CE, Thomas GR, Thiemermann C, Vane JR. The hemodynamic effects of endothelin-1 in the pithed rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S93-S97.
107. Pernow J, Franco-Cereceda A, Matran R, et al. Effect of endothelin-1 on regional vascular resistances in the pig. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S205-S206.
108. Asano T, Ikegaki I, Suzuki Y, et al. Endothelin and the production of cerebral vasoospasm in dogs. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 159: 1345-1351.
109. Miller Vm, Komori K, Burnett JC, et al. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1989; 257: H1127-H1131.
110. D'Orleans Juste P, Finet P, Sharl A, et al. Pharmacology of endothelin-1 in isolated vessels: effect of nicardipine, methylene blue, hemoglobin and gossypol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S46-S49.
111. Brain SD, Tippins JR, Williams TJ, et al. Endothelin induces potent microvascular constriction. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1005-1007.

112. Tippins JR, Antoniow JW, Maseri A. Endothelin is a potent constrictor in conductive and resistive arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S177-S179.
113. Stewart DJ, Baffour R. Functional state of the endothelium determines the response of endothelin in the coronary circulation. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 7-12
114. Dashwood MR, Turner M, Jacobs M. Endothelin-1: contractile responses and autoradiographic localization of receptors in rabbit blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S183-S185.
115. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon removal in porcine coronary arteries. *Circ Res* 1989; 65: 740-753.
116. Sakaino N, Kimura T. Denudation of endothelium enhances the response of pig coronary arteries to endothelin (abstract). *Circulation* 1989; 80 (suppl 2): 126.
117. Clozel JP, Clozel M. Effects of endothelin on the coronary vascular bed in open-chest dogs. *Circ Res* 1989; 65: 1193-1200.
118. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, et al. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989; 83: 1762-1767.
119. Fortes ZB, de Nucci C, García Leme J, et al. Effect of endothelin 1 on arterioles and venules in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S200-S201.
120. Yang MCM, Yu PC, Tu MS, et al. Effects of endothelin and vasopressin on portal pressure of rats. *Life Sci* 1990; 46: 1929-1936.
121. Armstead WM, Mirro R, Leffler CW, et al. Influence of endothelin in piglet microcerebral circulation. *Am J Physiol* 1989; 257: H707-H710.
122. Faraci FM. Effects of endothelin and vasopressin on cerebral blood vessels. *Am J Physiol* 1989; 257: H799-H803.
123. Kadel KA, Faraci FM, Heistad DD, et al. Effects of endothelin on blood flow to cerebrum and coroid plexus (abstract). *Circulation* 1989; 80 (suppl 2): 585.
124. MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH. Ocular effects of endothelins. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 705-709.
125. Brain SD. The direct observation of arteriolar constriction induced by endothelin in vivo. *Eur J Pharmacol* 1989; 160: 401-403.
126. Brain SD, Crossman DC, Buckley TL, et al. Endothelin-1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S147-S149.
127. Goetz KL, Wang BC, Madwed BC, et al. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am J*

Physiol 1988; 255: R1064-R1068.

128. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T. Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in conscious, unrestrained, Wistar rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S202-S204.

129. Minkes RK, Kadowitz PJ. Influence of endothelin on systemic arterial pressure and regional blood flow in the cat. *Eur J Pharmacol* 1989; 163: 163-166.

130. Minkes RK, Kadowitz PJ. Comparative responses to endothelin-2 and sarafotoxin 6B in systemic vascular bed of cats. *Am J Physiol* 1990; 258: H1550-H1558.

131. Tomobe Y, Miyauchi T, Saito A, et al. Effects of endothelin on the renal artery from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Eur J Pharmacol* 1988; 152: 373-374.

132. McMahon EG, Palomo MA, Moore WM. Phosphoramidon blocks the pressor activity of big endothelin 1-39 and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 16: 548-552.

133. Hughes AD, Thoms AM, Woodal N, et al. Human vascular responses to endothelin-1: observations in vivo and in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S225-S228.

134. Scoggins BA, Spence CD, Parkes DG, et al. Cardiovascular actions of human endothelin in conscious sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 235-238.

135. Whittle BJR, Payne AN, Esplugues JV. Cardiopulmonary and gastric ulcerogenic actions of endothelin-1 in the guinea pig and rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S103-S107.

136. Yokokawa K, Kohno M, Murakawa K, et al. Acute effects of endothelin on renal hemodynamics and blood pressure in anesthetized rats. *Am J Hypertens* 1989; 2: 715-719.

137. Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB, et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc* 1990; 65: 1441-1455.

138. Chappleau MW, Hajduczuk G, Abboud FM. Dual effects of endothelin on baroreceptor activity (abstract). *Circulation* 1989; 82 (suppl 3): 11.

139. Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, et al. Endothelin is a potent inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 159: 14-18.

140. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988; 255: H970-H973.

141. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor

- peptide. Pflugers Arch 1988; 413: 108-110.
142. Hu JR, Von Harsdorf R, Lang RE. Endothelin has potent inotropic effects in rat atria. Eur J Pharmacol 1988; 158: 275-278.
143. Ryan US, Glassberg MK, Nolop KB. ET-1 from pulmonary artery and microvessels acts on vascular and airway smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13 (suppl 5): S57-S62.
144. Black PN, Ghatei K, Takahashi D, et al. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. FEBS Lett 1989; 255: 129-132.
145. Rozengurt N, Springall DR, Polak JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. J Pathol 1990; 160: 5-8.
146. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 9797-8000.
147. Sirvio ML, Metsarinne K, Saijonmaa O, et al. Tissue distribution and half-life of 125-I endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. Biochem Biophys Res Com 1990; 167: 1191-1195.
148. Rimar S, Gillis CN. Differential uptake of endothelin by rabbit coronary and pulmonary circulations (abstract). Circulation 1989; 80: II-213.
149. Ohtsuka M, Uchida Y, Saotoma M, et al. Endothelin exerts to human pulmonary artery as a vasoconstrictor in vitro (abstract). Am Rev Respir Dis 1989; 139: A51.
150. Braquet P, Touvay C, Lagente V, et al. Effect of endothelin 1 on blood pressure and bronchopulmonary system of the guinea pig. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13 (suppl 5): S143-S146.
151. Nossaman B, Pareti KS, Ragheb MS, et al. Comparative effects of endothelin-2 and endothelin-3 on the feline vascular pulmonary bed (abstract). Circulation 1989; II-288.
152. Horgan MJ, Pinheiro MB, Malik MB. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. Circ Res 1991; 69: 157-164.
153. Holden WE, McCall E. Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. Exp Lung Res 1984; 7: 101-112.
154. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. Hypertension 1989; 13: 658-667.
155. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?. Ann Int Med 1991; 114: 464-469.

156. Maggi CA, Patachini R, Giuliani S, et al. Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 1989; 160: 179-182.
157. Uchida Y, Ninomiya H, Sataome M, et al. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 1988; 154: 227-228.
158. Lagente V, Chabrier PE, Mencia JM, et al. Pharmacological modulation of the bronchopulmonary action of the vasoactive peptide, endothelin, administered by aerosol in the guinea-pig. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 158: 625-632.
159. Watanabe A, Kameyama M, Saotome M, et al. Increased plasma endothelin-1 levels during asthmatic attacks. Abstracts of 13th World Congress of Asthmology, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan, Oct 1990: 4.
160. Nomura A, Uchida Y, Kameyama M, et al. Endothelin and bronchial asthma. *Lancet* 1989; 2: 747-748.
161. Springall DR, Howarth PH, Counihan H, et al. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet* 1991; 1: 697-701.
162. Nagase T, Fukuchi Y, Jo C, et al. Endothelin-1 stimulates arachidonate 15-lipoxygenase activity and oxygen radical formation in the rat distal lung. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 168: 485-489.
163. Pernow J, Boutier JF, Franco-Cereceda A, et al. Potent selective vasoconstrictor effects of endothelin in the pig kidney in vivo. *Acta Physiol Scand* 1989; 134: 573-574.
164. Koseki C, Imai M, Hirata Y, et al. Binding sites for endothelin-1 in rat tissues: an autoradiographic study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S153-S154.
165. Nuñez DJ, Brown MJ, Davenport AP, et al. ET-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest* 1990; 85: 1537-1541.
166. López Farré A, Montañes I, Millás I, López Novoa JM. Effect of endothelin on renal function in rats. *Eur J Pharmacol* 1989; 163: 187-189.
167. King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989; 256: F1051-F1058.
168. Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, et al. Mesangial cell, glomerular, and renal vascular responses to endothelin in the kidney. *J Clin Invest* 1989; 83: 336-339.
169. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates contraction of mesangial cells and potentiates Beta adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* 1990; 85: 790-794.

170. Orita Y, Fugiwara Y, Ochi S, et al. Endothelin-1 receptors in rat glomeruli. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S159-S161.
171. López Farré A, Olivera A, Montañés I, et al. Endotelina: estructura, función y posibles implicaciones fisiopatológicas. *An C Int* 1989; 4: 43-49.
172. Kon V, Badr KF. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int* 1991; 40: 1-12.
173. Hildebrand FL, Burnett JC. ET at pathophysiologic concentrations is a potent renal vasoconstrictor resistant to atrial natriuretic factor (abstract). *J Am Coll Car* 1990; 15 (suppl A): 156A.
174. Miller WL, Cavero PG, Aarhus LL, et al. ET-mediated arterial vasoconstriction is heterogeneous and attenuated by nitroglicerín (abstract). *Clin Res* 1989; 37: 930A.
175. López Farré A, Montañés I, Millás I, Fernández Cruz A, et al. Verapamil blunts the effect of endothelin on renal function in rats. *Med Sci Res* 1990; 18: 323-324.
176. Rakugi H, Nakamura M, Saito H, et al. Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 155: 1244-1247.
177. Matsumura Y, Nakase K, Ikegawa RI, et al. The endothelium derived vasoconstrictor peptide endothelin inhibits renin release in vitro. *Life Sci* 1989; 44: 149-157.
178. Takagi M, Matsuoka H, Atarashi K, et al. Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 157: 1164-1168.
179. Koyama H, Tabata T, Nishzawa Y, et al. Plasma endothelin levels in patients with uremia. *Lancet* 1989; 1: 991-992.
180. Firth JD, Raine AE, Ratcliffe PJ, et al. Endothelin: an important factor in acute renal failure. *Lancet* 1988; 1: 1179-1180.
181. Kon V, Sugiura M, Inagami T, et al. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990; 37: 1487-1491.
182. Bunchman TE, Brookshire CA. Cyclosporine-induced synthesis of ET by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 310-314.
183. Bunchman TE, Brookshire CA. Smooth muscle cell proliferation by conditioned media from cyclosporine-treated endothelial cells: a role of endothelin. *Trans Proc* 1991; 23: 967-968.
184. Ohta K, Hirata Y, Shichiri M, et al. Cisplatin-induced urinary endothelin excretion. *JAMA* 1991; 265: 1391-1392.

185. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin peptides: a role in glomerular inflammation. *Lab Invest* 1991; 64: 1-4.
186. Zoja C, Orisio S, Perico N, et al. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by TGF- β , thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest* 1991; 64: 16-21.
187. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelins: a family of regulatory peptides. *Hypertension* 1991; 17: 856-863.
188. Valentin JP, Gardner DG, Wiedeman E, et al. Modulation of endothelin effects on blood pressure and hematocrit by atrial natriuretic peptide. *Hypertension* 1991; 17: 864-869.
189. Stasch JP, Hirth C, Kazda S, et al. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci* 1989; 45: 869-875.
190. Kohzuki M, Johnston CI, Chai SY, et al. ET receptors in rat adrenal gland visualized by quantitative autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 239-242.
191. Morishita R, Higaki J, Ogihara T. ET stimulates aldosterone biosynthesis by dispersed rabbit adreno-capsular cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 160: 628-632.
192. Roubert P, Gillard PR, Plas JM, et al. Angiotensin 2 potently down-regulates endothelin binding sites in vascular cells (abstract). *Circulation* 1990; 82: II-197.
193. Boarder MR, Marriot DB. Characterization of ET-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S223-S224.
194. Tabuchi Y, Nakamaru M, Rakugi H, et al. ET enhances adrenergic vasoconstriction in perfused rat mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 159: 1304-1308.
195. Warner TD, D'Orleans-Juste P, Vane JR. ET-1 and U46619 potentiate selectively the venous responses to nerve stimulation within the perfused superior mesenteric vascular bed of the rat. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 172: 745-750.
196. Hirai M, Miyabo S, Ooya E, et al. Endothelin-3 stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Life Sci* 1991; 48: 2359-2363.
197. Stojilkovic SS, Merelli F, Iida T, et al. Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science* 1990; 248: 1663-1666.
198. Samson WK, Skala KD, Alexander BD, et al. Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 169: 737-743.

199. Yoshizawa T, Shinmi O, Giaid A, et al. Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science* 1990; 247: 462-464.
200. Togashi K, Ando K, Kameya T, et al. Regional distribution of immunoreactive endothelin-1 in the human central nervous system. *Biomed Res* 1991; 12: 161-163.
201. Fuxe K, Anggard E, Lundgren A, et al. Localization of 125-I-ET1 and 125-I-ET3 binding sites in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 1989; 137: 563-564.
202. Jones CR, Hiley CR, Pelton JT, et al. Autoradiographic localization of the binding sites for 125-I-ET in rat and human brain. *Neurosci Lett* 1989; 97: 276-279.
203. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, et al. Abundance of ET-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 164: 74-80.
204. Giaid AS, Gibson SJ, Ibrahim N, et al. Endothelin-1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and basal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7634-7638.
205. Hirata Y, Matsunaga T, Ando K, et al. Presence of ET-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 166: 1274-1278.
206. Kobayashi H, Hayasi M, Kobayashi S, et al. Effect of endothelin on the canine basilar artery. *Neurosurgery* 1990; 27: 357-631.
207. Saito A, Shiba R, Kimura S, et al. Vasoconstrictor response of large cerebral arteries of cats to endothelin, and endothelium-derived vasoactive peptide. *Eur J Pharmacol* 1989; 162: 353-358.
208. Taga K, Fukuda S, Nishimura N, et al. Effects of thiopental, Pentobarbital, and ketamine on endothelin-induced constriction of porcine cerebral arteries. *Anesthesiology* 1990; 72: 939-941.
209. Shirahase H, Usui H, Shimaji H, et al. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions induced by endothelin-1 in canine basilar arteries. *Life Sci* 1991; 49: 273-281.
210. Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C, et al. Endothelin is a potent constrictor of human intracranial arteries and veins. *Blood Vessels* 1989; 26: 249-253.
211. Willette RN, Feuerstein G, Ohlstein EH. Cerebral microvascular effects of endothelin (abstract). *Circulation* 1990; II-563.
212. Kadel KA, Faraci FM, Heistad DD, et al. Effects of endothelin on blood flow to cerebrum and choroid plexus (abstract). *Circulation* 1990; II-585.

213. Mima T, Yanagisawa M, Shigeno T, et al. Endothelin acts in feline arteries from the adventitial side. *Stroke* 1989; 20: 1553-1556.
214. Koseki C, Imai M, Hirata Y, et al. Autoradiographic localization of 125-I-ET-1 binding sites in rat brain. *Neurosci Res* 1989; 6: 581-585.
215. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, et al. Endothelin-3 as a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of ET-1 and ET-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 164: 587-593.
216. Yoshizawa T, Kimura S, Kanazawa Y, et al. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurons: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci Lett* 1989; 102: 179-184.
217. Moser PC, Pelton JT. Behavioural effects of centrally administered ET in the rat. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 347P.
218. Hokfelt T, Post C, Freedman J, et al. Endothelin induces spinal lesions after intrathecal administration. *Acta Physiol Scand* 1989; 137: 555-556.
219. Shichiri M, Hirata Y, Kanno K, et al. Effect of endothelin on release of arginine-vasopressin from perfused rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 163: 1332-1337.
220. Hoffman A, Keiser HR, Grossman E, et al. Endothelin concentrations in cerebrospinal fluid in depressive patients. *Lancet* 1989; 2: 1519.
221. Ouchi Y, Kim S, Souza S, et al. Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 1989; 256: H1741-H1751.
222. Han SP, Chen X, Westfall TC, et al. Characterization of the depressor effect of intrathecal endothelin in anesthetized rats. *Am J Physiol* 1991; 260: H1685-H1691.
223. Ide K, Yamakawa K, Nakagomi T, et al. The role of ET in the pathogenesis of vasospasm following subarachnoidal hemorrhage. *Neurol Res* 1989; 11: 101-104.
224. Papadopoulos SM, Gilbert LL, Webb RC, et al. Characterization of contractile responses to endothelin in human cerebral arteries: implication for cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 1990; 26: 810-815.
225. Tani E, Yamagata S, Ito Y. Intercellular granules and vesicles in prolonged cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 1978; 48: 179-189.
226. Kobayashi H, Hayashi M, Kobayashi S, et al. Cerebral vasospasm and vasoconstriction caused by endothelin. *Neurosurgery* 1991; 28: 673-679.
227. Alafaci C, Jansen I, Arbab MAR, et al. Enhanced vasoconstrictor effect of ET in cerebral arteries from rats with subarachnoid hemorrhage. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 317-319.

228. Masaoka H, Suzuki R, Hirata Y, et al. Raised plasma ET in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Lancet* 1989; 2: 1402.
229. Fujimori A, Yanagisawa M, Saito A, et al. Endothelin in plasma and CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Lancet* 1990; 1: 633.
230. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, et al. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989; 78: 225-228.
231. McCumber MW, Ross CA, Snyder SH. ET in the brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2359-2363.
232. Brown KD, Littlewood CJ. ET stimulates DNA synthesis in swiss 3T3 cells: synergy with polypeptide growth factors. *Biochem J* 1989; 263: 977-980.
233. Dubin D, Pratt RE, Cooke JP, et al. Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle cell mitogen. *J Vasc Med Biol* 1989; 1: 150-154.
234. Muldoon LL, Pribnow D, Rodland KD, et al. ET-1 stimulates DNA synthesis and anchorage-independent growth of rat fibroblasts through a protein kinase-C dependent mechanism. *Cell Regulation* 1990; 1: 379-390.
235. Simonson MS, Wann S, Mene P, et al. ET stimulates phospholipase C, Na/K exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 708-712.
236. Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, et al. ET-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 158: 880-883.
237. Supattapone S, Simpson AWM, Ashley CC. Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 165: 1115-1122.
238. Serradeillego C, Herbert JM, García C, et al. Importance of the phenotypic state of the vascular smooth muscle cells on the binding and the mitogenic activity of endothelin. *Peptides* 1991; 12: 575-579.
239. Vigne P, Marsault R, Breittmayer JP, et al. ET stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* 1990; 266: 415-420.
240. Muldoon L, Rodland KD, Forsythe ML, et al. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 8529-8536.
241. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, et al. Endothelin induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991; 69: 209-215.

242. Fernández Cruz A. Comunicación personal.
243. Wallace JC, Cirino C, de Nucci C, et al. ET has a potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am J Physiol* 1989; 256: G661-G666.
244. Whittle BJ, Payne AN, Esplugues JV, et al. Cardiopulmonary and gastric ulcerogenic actions of ET-1 in the guinea pig and rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S103-S107.
245. Kanaleh MB. Endothelin: an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1989; 32 (suppl 4): S76.
246. Kanno MB, Hirata Y, Emori T, et al. Endothelin and Raynaud's phenomenon. *Am J Med* 1991; 90: 130-131.
247. Kanno K, Hirata Y, Shichiri M, et al. Raised circulating ET-1 in vascular disease and its pathogenetic role in Raynaud's phenomenon (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-226.
248. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Metsarinne K, et al. raised plasma ET-1 levels during cold pressor test. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 169: 217-221.
249. Hynynen M, Ilmarinen R, Saijonmaa O, et al. Plasma ET-1 concentration during cold exposure. *Lancet* 1991; 1: 1104-1105.
250. Kanno K, Hirata Y, Numano F, et al. Endothelin-1 and vasculitis. *JAMA* 1990; 264: 2868.
251. Weitzberg E, Lundberg JM, Rudehill A. Elevated plasma levels of endothelin in patients with sepsis syndrome. *Circ Shock* 1991; 33: 222-227.
252. Ishibashi M, Saito K, Watanabe K, et al. Plasma ET-1 levels in patients with disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1991; 324: 1516-1517.
253. Hirata Y, Itoh KI, Ando K, et al. Plasma ET levels during surgery. *N Engl J Med* 1989; 321: 1686.
254. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, et al. Elevated plasma endothelin levels in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33: 306-310.
255. Tesfamarian B, Brown ML, Deykin D, et al. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 85: 929-932.
256. Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, et al. Enhanced secretion of ET-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1990; 267: 16-18.
257. Shichiri M, Hirata Y, Ando K, et al. Plasma endothelin levels in patients with arterial hypertension and end-stage renal failure.

Circulation 1989; 80 (suppl 2): II-25.

258. Kohno M, Yasunari K, Murakawa KI, et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med* 1990; 88: 614-618.

259. Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, et al. Increased plasma ET levels in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 322: 405.

260. Davenport AP, Ashby MJ, Easton P, et al. A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma: comparison of levels in patients with essential hypertension and normotensive control subjects. *Clin Sci* 1990; 78: 261-264.

261. Miyauchi T, Yanagisawa M, Suzuki N, et al. Venous plasma concentrations of ET in normal and hypertensive subjects. *Circulation* 1989; 80 (suppl 2): II-573.

262. Cairns HS, Rogerson M, Fairbanks LD, et al. Endothelin and cyclosporine nephrotoxicity. *Lancet* 1988; 2: 1496-1497.

263. Lerman A, Click RL, Narr BJ, et al. Elevation of plasma ET associated with systemic hypertension following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 646-650.

264. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1991; 323: 22-7.

265. Kohno M, Murakawa K, Horio T, et al. Plasma immunoreactive ET-1 in experimental malignant hypertension. *Hypertension* 1991; 18: 93-100.

266. Kaplan NM. Hormonal and local factors in hypertension. *Am J Med Sci* 1991; 301: 412-420.

267. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, et al. Increased plasma ET-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Car* 1991; 18: 38-43.

268. Ray GS, McMurray J, Morton JJ. Endothelin and Atrial Natriuretic Peptide in acute myocardial infarction (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-279.

269. Yasuda M, Kohno M, Tahara A, et al. Circulating immunoreactive ET in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1990; 119: 801-806.

270. Tsuji S, Sawamura A, Watanabe H, et al. Plasma ET levels during myocardial ischemia and reperfusion. *Life Sci* 1991; 48: 1745-1749.

271. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, et al. ET in myocardial infarction. *Nature* 1990; 344: 114.

272. Luscher TF. Endothelin. Key to coronary vasospasm ?. *Circulation* 1991; 83: 701-703.

273. Toko-Oka T, Aizawa T, Suzuki N, et al. Increased plasma level of ET-1 and coronary spasm induction in patients with vasospastic angina pectoris. *Circulation* 1991; 83: 476-483.
274. Matsuyama K, Saito Y, Nakao K, et al. Endothelin in myocardial ischemia induced by coronary spasm (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-443.
275. Arendt RM, Wilpert-Lampen U, heucke L, et al. Increased plasma ET in patients with hyperlipoproteinemia and stable or unstable angina (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-248.
276. Estrada V, Fernández Durango R, Moya J, et al. Endothelin levels in unstable angina before and after coronary angioplasty (abstract). *Eur Heart J* 1991; 12: 161.
277. Stewart DJ, Nisbet JA, Davies MJ. Plasma ET in coronary venous blood from patients with either stable or unstable angina. *Br Heart J* 1991; 66: 7-9.
278. Stewart DJ, Cernacek P. Plasma ET levels are markedly elevated in cardiogenic shock (abstract). *Circulation* 1989; 80 (suppl 2): II-587.
279. Cernacek P, Stewart DJ. Immunoreactive ET in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 161: 562-567.
280. Grenier O, Komajda M, Maistre G, et al. Endothelin plasma concentration is increased in chronic congestive heart failure (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-381.
281. Margulies KB, Hildebrand FL, Lerman A, et al. Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 1990; 82: 2226-2230.
282. Shichiri M, Hirata Y, Ando K, et al. Postural change and volume expansion affect plasma ET levels. *JAMA* 1990; 263: 261.
283. Totsune K, Mouri T, Takahashi K, et al. Detection of immunoreactive ET in plasma of hemodialysis patients. *FEBS Lett* 1989; 249: 239-242.
284. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide ?. *Lancet* 1991; 337: 776-778.
285. Fukuda S, Taga K, Shimoji K, High sensitivity of porcine cerebral arteries to endothelin. *Experientia* 1991; 47: 475-477.
286. Matsumura Y, Ikegawa R, Suzuki Y, et al. Phosphoramidon prevents cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in dogs. The relationship to ET-1 levels in cerebrospinal fluid. *Life Sci* 1991; 11: 841-848.
287. Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, et al. Interleukin-1 increases the production of ET-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 166: 324-329.

288. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, et al. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. *J Exp Med* 1989; 169: 333-338.
289. Waage A, Espevik T. Interleukin-1 potentiates the lethal effect of TNF/cachectin on mice. *J Exp Med* 1988; 167: 1987-1991.
290. Sessa W, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of ET-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Com* 1991; 174: 613-618.
291. Ager A. Dynamic interactions between lymphocytes and vascular endothelial cells. In Warren JB, ed., *The endothelium: introduction to current research*. Wiley-Liss, Inc, N.York, 1990: 229-252.
292. Bjerknes M, Cheng H, Ottoway CA. Dynamics of lymphocyte-endothelial interactions in vivo. *Science* 1986; 231: 402-405.
293. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 1985; 65: 513-525.
294. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature (Lond)* 1981; 289: 646-650.
295. Pittet JF, Morel DR, Hensen A, et al. Elevated plasma ET-1 concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. *Ann Surg* 1991; 213: 261-264.
296. Menard J, Guyenne M, Corvol P, et al. Direct immunometric assay of active renin in human plasma. *J Hypertension* 1985; 3 (suppl.3): 5275-5278.
297. Blazy I, Guillot F, Laborde K, et al. Comparison of plasma renin and prorenin in healthy infants and children as determined with an enzymatic method and a new direct immunoradiometric assay. *Scand J Clin Lab Invest* 1989; 49: 413-418.
298. Gamulin Z, Forster A, Morel D, et al. Effects of infrarenal aortic crossclamping on renal hemodynamics in humans. *Anesthesiology* 1984; 61: 394-399.
299. Paul MD, Mazer CD, Byrick RJ, et al. Influence of mannitol and dopamine on renal function during elective infrarenal aortic clamping in man. *Am J Nephrol* 1986; 6: 427-434.
300. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248: C550-C556.
301. Kwan YW, Wadsworth RM, Kane KA. Hypoxia determines vasoconstriction on cultured canine coronary strips. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 857-863.

302. Elliott DA, Ong BY, Bruni JE, et al. The effect of anoxia on cultured porcine basilar artery tonus. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 949-955.
303. Langleben D, Cernacek P, Stewart DJ. Moderate hypoxia or hyperoxia do not alter ET release from bovine pulmonary endothelium in vitro. *Circulation* 1989; 80(suppl 2): II-288.
304. Douglas SA, James S, Hiley CR. Endothelial modulation and changes in endothelin pressor activity during hypoxia in the rat isolated perfused superior mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1441-1448.
305. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C, et al. Total ischemia. III. Effect of inhibition of anaerobic glycolysis. *J Moll Cell Cardiol* 1989; 21 (suppl 1): 37-54.
306. Poole-Wilson PH. Measurement of myocardial intracellular pH in pathological states. *J Moll Cell Cardiol* 1978; 10: 511-526.
307. De Jong JW, Harmeson E, De Tombe PP, et al. Nifedipine reduces adenine nucleotide breakdown in ischemic rat heart. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 89-96.
308. Hirche HJ, Franz CR, Bos L, et al. Myocardial extracellular K⁺ and H⁺ increase and noradrenaline release as a possible cause of early arrhythmias following acute coronary occlusion in pigs. *J Moll Cell Cardiol* 1980; 12: 554-578.
309. Julicher RHM, Tjburg LBM, Sterremberg L, et al. Decreased defence against free radicals in rat heart during normal reperfusion after hypoxic, ischemic, and calcium-free perfusion. *Life Sci* 1984; 35: 1281-1288.
310. Antonucci F, Bertolissi M, Calo L. Plasma endothelin and renal function during infrarenal aortic crossclamping and nifedipine infusion. *Lancet* 1990; 336: 1449.
311. Liu J, Gu XH, Casley DJ, et al. Reoxygenation, but neither hypoxia nor intermittent ischemia, increases 125-I-ET-1 binding to rat cardiac membranes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15: 436-443.
312. Braunwald E. Unstable angina: a classification. *Circulation* 1989; 40: 410-416.
313. Adams PC, Rellong RS, Gatherorn P, et al. Platelet vessel interactions, rheologic factors and thrombogenic substrate in acute coronary syndromes: preventive strategies. *Am J Cardiol* 1987; 60: 9G-17G.
314. Sherman CT, Litvak F, Grundfest W, et al. Coronary angiography in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med* 1986; 315: 913-919.

315. Franco Cereceda A. Endothelin and neuropeptide Y-induced vasoconstriction of human epicardial coronary arteries in vitro. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 968-972.
316. Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, et al. Lethal ischemia due to intracoronary ET in pigs. *Am J Physiol* 1989; 257: H339-H343.
317. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.
318. Lopez JAG, Armstrong ML, Piegors DJ, et al. Vascular responses to endothelin in atherosclerotic primates. *Clin Res* 1989; 37: 883A.
319. Boulanger C, Luscher TF. Release of ET from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-590.
320. Kurihara H, Yamaoki K, Nagai R, et al. Endothelin: a potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm. *Life Sci* 1989; 44: 1937-1943.
321. Vane JR, Botting R, Masaki T. Endothelin: International Workshop held in London, 5-6 December 1988. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5).
322. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin: biological actions and mechanisms of signal transduction. *ACE Report* 1990; 64: 1-8.
323. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, et al. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989; 79: 287-291.
324. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363-373.
325. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombus with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 1985; 71: 699-708.
326. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal in porcine coronary arteries. *Circ Res* 1989; 65: 740-753.
327. Bates ER, McGuillem MJ, Beals TF, et al. Effect of angioplasty-induced endothelial denudation compared with medial denudation on regional coronary blood flow. *Circulation* 1987; 76: 710-716.
328. Wilson RF, Johnson MR, Marcus ML, et al. The effect of coronary angioplasty on coronary flow reserve. *Circulation* 1988; 77: 873-875.
329. Manyari DE, Knudtson M, Kloiber R, et al. Sequential Thallium-201 myocardial perfusion studies after successful percutaneous coronary

angioplasty: delayed resolution of exercise-induced scintographic abnormalities. *Circulation* 1988; 77: 86-95.

330. Wilson RF, Laxson DD, Lesser JR, et al. Intense microvascular constriction after angioplasty of acute thrombotic coronary arterial lesions. *Lancet* 1989; 1: 807-811.

331. Kadel KA, Lopez AG, Rossen DA, et al. Coronary sinus endothelin levels rise after coronary balloon angioplasty (abstract). *Circulation* 1990; 82: III-627.

332. Shiba R, Yanagisawa M, Miyauchi T, et al. Elimination of intravascular injected ET-1 from the circulation in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S98-S101.

333. Antman E, Muller J, Goldberg S, et al. Nifedipine therapy for coronary artery spasm. *N Engl J Med* 1980; 302: 1269-1274.

334. Mitsuhashi T, Morris RC, Ives JE. Endothelin-induced increases in vascular smooth muscle Ca²⁺ do not depend on dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* 1989; 84: 635-639.

335. Ohlstein EH, Horohonich S, Hay DWP. Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250: 548-555.

336. Secrest RJ, Cohen ML. Endothelin: differential effects in vascular and nonvascular smooth muscle. *Life Sci* 1989; 45: 1365-1372.

337. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, et al. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3915-3918.

338. Xuan YT, Whorton AR, Watkins WD. Inhibition by nifedipine on endothelin-mediated inositol phosphate formation and Ca²⁺ mobilization in smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 160: 758-764.

339. Wallnofer A, Weir S, Ruegg U, et al. The mechanism of action of endothelin-1 as compared with other agonists in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S23-S31.

340. Chabrier PE, Auguet M, Roubert P, et al. Vascular mechanism of action of endothelin-1: effect of Ca²⁺ antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S32-S35.

341. Stasch JP, Kazda S. Endothelin-1-induced vascular contractions: interactions with drugs affecting the calcium channel. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S63-S66.

342. Gruentzig AR, King SB, Schlumpf M, et al. Long term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the early Zurich experience. *N Engl J Med* 1987; 316: 1127-1132.

343. Guiteras Val P, Bourassa MG, David PR, et al. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: The Montreal Heart Institute experience. *Am J Cardiol* 1987; 60: 50B-60B.

344. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, et al. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big-endothelin in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; 2: 53-54.
345. Salminen K, Tikkanen I, Saijonmaa O, et al. Modulation of coronary tone in acute myocardial infarction by endothelin. *Lancet* 1989; 2: 747.
346. Spielberg CH, Schwenn K, Hensen J, et al. Hourly measurement of plasma endothelin levels in acute myocardial infarction (abstract). *Eur Heart J* 1991; 12: 159.
347. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, et al. Contribution of ET to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circ Res* 1991; 69: 370-377.
348. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N. Endogenous endothelin contributes to the extension of myocardial infarction (abstract). *Circulation* 1990; 269: II-397.
349. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 88: 1054-1057.
350. Tomoda H. Intracoronary thrombus and endothelin production in acute myocardial infarction (abstract). *Eur Heart J* 1991; 12: 160.
351. Jennings RB, Hawkins HK, Loewe JE, et al. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Cardiol* 1987; 92: 187-204.
352. Corr PB, Gross RW, Sobel BE. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ Res* 1984; 55: 135-154.
353. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987; 60: 153-168.
354. Grill HP, Flaherty JT, Weisfelt ML, et al. Direct measurement of free radicals in an in vivo model of regional ischemia and reperfusion. *Circulation* 1987; 76: 196.
355. Burton KP, McCord JM, Ghai H, et al. Myocardial alterations due to free radical generation. *Am J Physiol* 1984; 246: H776-H783.
356. Tilton RG, Williamson EK, Cole PA, et al. Coronary vascular hemodynamic and permeability in isolated, diltiazem treated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7: 424-436.
357. Harris TR, Overholser KA, Stiles RG. Concurrent increases in resistance and transport after coronary obstruction in dogs. *Am J Physiol* 1981; 240: H262-H273.
358. Gorman MW, Sparks HV. Progressive coronary vasoconstriction during relative ischemia in canine myocardium. *Circ Res* 1982; 51: 411-420.

359. Van Meel JCA, De Jonge A, Kalkman HO, et al. Vascular smooth muscle contraction initiated by postsynaptic alfa2 adrenoreceptor activation is initiated by an influx of extracellular calcium. *Eur J Pharmacol* 1981; 69: 205-208.
360. Li K, Stewart DJ, Rouleau JL. Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. *Circ Res* 1991; 69: 301-312.
361. Yorikane R, Shiga H, Miyake S, et al. Evidence for direct arrhythmogenic action of endothelin. *Biochem Biophys Res Com* 1990; 173: 457-462.
362. Salvati P, Chierchia S, Dho L, et al. Proarrhythmic activity of intracoronary endothelin in dogs. Relation to the site of administration and to changes in regional flow. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 1007-1014.
363. Sheridan DJ, Penkoske PA, Sobel BE, et al. Alpha adrenergic contribution to dysrhythmia during myocardial ischemia and reperfusion in cats. *J Clin Invest* 1980; 65: 161-171.
364. Gutierrez Marcos FM, Fernández Cruz A, Gutkowska J, et al. Atrial natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction without functional heart failure. *Eur Heart J* 1991; 12: 503-507.
365. Del Río F, Estrada V, Herrero C, et al. Endotelina-1, factor natriurético atrial y renina en el infarto de miocardio (abstract). *Clin Invest Arteriosclerosis* 1991; 3(supl 2): 3.
366. Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, et al. Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin-II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 87: 1999-2004.
367. Zimmerman RS, Martínez AJ, Barbee RW. Atrial natriuretic factor blocks the pressor action of endothelin (abstract). *Circulation* 1989; 80 (supl 2): II-360.
368. Fukuda Y, Hirata Y, Yoshimi H, et al. Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Com* 1988; 155: 167-172.
369. Schiebinger RJ, Gómez Sánchez CE. Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependence on calcium. *Endocrinology* 1990; 127: 119-125.
370. Tetsuo K, Chang H, Uchida S, et al. Direct effect of endothelin in the rat kidney. *Am J Physiol* 1990; 258: F397-F402.
371. Munger KA, Sugiura M, Inagami T, et al. Atrial natriuretic factor mediates endothelin induced natriuresis in the rat (abstract); *Kidney Int* 1990; 37: A375.

372. Gutierrez Marcos FM, Fernández Cruz A. Péptido natriurético atrial y corazón: nuevas perspectivas. *Rev Clin Esp* 1990; 188: 418-420.
373. Espiner EA, Richards AM. Atrial natriuretic peptide: an important factor in sodium and blood pressure regulation. *Lancet* 1989; 1: 707-710.
374. Schiebinger RJ, Linden J. Effect of atrial contraction frequency on atrial natriuretic peptide secretion. *Am J Physiol* 1986; 251: H1095-H1099.
375. Nicklas JM, DiCarlo LA, Koller PT, et al. Plasma levels of immunoreactive atrial natriuretic factor increase during supraventricular tachycardia. *Am Heart J* 1986; 112: 923-928.
376. Espiner E, Nicholls MG, Yandle TG, et al. Studies on the secretion, metabolism, and action of atrial natriuretic peptide in man. *J Hypertens* 1986; 4(Suppl 2): S85-S91.
377. Cogan MG. Nephrology forum: Atrial natriuretic peptide. *Kidney Int* 1990; 37: 1148-1160.
378. Packer M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 1988; 77: 721-729.
379. Gutkowska J, Horky K, Thibault G, et al. Atrial natriuretic factor is a circulating hormone. *Biochem Biophys Res Com* 1984; 125: 593-601.
380. Andreotti FR, Davies GJ, Hackett DR et al. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988; 62: 635-637.
381. Muller JE, Tofler GH. Circadian variation and cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1991; 325: 1038-1039.
382. Gelmers HJ, Gorter K, de Weerd C, et al. A controlled trial of nimodipine in acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1988; 318: 203-207.
383. Kadel KA, Heistad DD, Faraci FM. Effects of endothelin on blood vessels of the brain and choroid plexus. *Brain Res* 1990; 518: 78-82.
384. Clozel M, Clozel JP. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250: 1125-1131.
385. Shigeno T, Mima T, Takakura M, et al. Endothelin-1 acts in cerebral arteries from the adventitial but not from the luminal side. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (Suppl 5): S174-S176.
386. Hosli E, Hosli H. Autoradiographic evidence for endothelin receptors on astrocytes in cultures of rat cerebellum, brainstem and spinal cord. *Neurosci Lett* 1991; 129: 55-58.
387. Davenport AP, Morton AJ. Binding sites for I-125 ET-1, ET-2, ET-3 and vasoactive intestinal contractor are present in adult rat brain and

neurone-enriched primary cultures of embryonic brain cells. *Brain Res* 1991; 554: 278-285.

388. Hamilton MG, Frew R, Lundy MP. Effect of endothelin on Ca²⁺ influx, intracellular free Ca²⁺ levels and ligand binding to N and L type Ca²⁺ channels in rat brain. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 1332-1338.

389. Koller J, Mair P, Wieser C, et al. Endothelin and big-endothelin in injured patients. *N Engl J Med* 1991; 325: 1518.

390. Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 1990; 66: 1088-1094.

391. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.

392. Kistler JP, Ropper AA, Martin JB. Cerebrovascular diseases. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th edition. Wilson, Braunwald, Isselbacher, Petersdorf, Martin, Fauci, Root, eds. McGraw Hill, N York, 1991, 1977-2002.

393. Luscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function?. Boca Raton, Fla. CRC Press, 1990: 1-215.

394. Martinez Vila E, Martinez Lage JM, Guillen F, et al. Nimodipine in acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1988; 319: 249.

395. Gelmers HJ. The effects of nimodipine on the clinical course of patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 1984; 69: 232-239.

396. Gelmers HJ, Hennerici M. Effect of nimodipine on acute ischemic stroke: pooled results from five randomised trials. *Stroke* 1990; 21 (Suppl IV): IV 81-84.

397. Bone RC, Fisher CJ, Terry P, et al. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989; 17: 389-393.

398. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, et al. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338: 732-739.

399. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818-829.

400. Elebute EA, Stoner HB. The grading of sepsis. *Br J Surg* 1983; 70: 29-31.

401. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Int Med* 1991; 115: 457-469.

402. Young JS, Headrick JP, Berne RM. Endothelial-dependent and independent responses in the thoracic aorta during endotoxic shock. *Circ Shock* 1991; 35: 25-30.

403. Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial injury and regeneration: IV. Endotoxin: a nondenuding injury to aortic endothelium. *Lab Invest* 1983; 48: 25-34.
404. Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Cachectin/TNF-alpha in septic shock and septic adult distress respiratory syndrome. *Am Rev Resp Dis* 1988; 138: 1377-1379.
405. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338: 732-739.
406. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans; advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Int Med* 1990; 113: 227-242.
407. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR et al. Recombinant TNF induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4533-4537.
408. Sprung CL, Schultz DR, Marcial E, et al. Complement activation in septic shock patients. *Crit Care Med* 1986; 14: 525-528.
409. Jacobs RF, Tabor DR. Immune cellular interactions during sepsis and septic injury. *Crit Care Clin* 1989; 5: 9-26.
410. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, et al. Prognosis values of TNF/cachectin, interleukin 1, alpha interferon and gamma interferon in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 1990; 161: 982-987.
411. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med* 1987; 38: 417-432.
412. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-473.
413. Chung KC, Barnes PJ. Platelet activating factor: a potent mediator of inflammation. *Postgrad Med J* 1989; 65: 420-426.
414. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology of human diseases. *N Engl J Med* 1990; 323: 645-655.
415. Petrak RA, Balk RA, Bone RC. Prostaglandins, cyclooxygenase inhibitors, and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* 1989; 5: 303-314.
416. Ognibene FP, Parker MM, Burch-Withman C, et al. Neutrophil aggregating activity and septic shock in humans: neutrophil aggregation by a C5a-like material occurs more frequently than complement component depletion and correlates with depression of systemic vascular resistance. *J Crit Care* 1988; 3: 103-111.

417. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, et al. Neutrophil mediated injury to endothelial cells; enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986; 77: 1233-1243.
418. Haglund U, Gerdin B. Oxygen-free radicals and circulatory shock. *Circ Shock* 1991; 34: 405-411.
419. Pernow J, Hemsén A, Hallén A, Lundberg JM. Release of endothelin-like immunoreactivity in relation to neuropeptide Y and catecholamines during endotoxin shock and asphyxia in the pig. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 311-322.
420. Thiemermann C, Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharm* 1990; 182: 591-595.
421. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338: 1557-1558.
422. Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial?. *Lancet* 1991; 338: 1555-1557.
423. Anónimo. Nitric oxide in the clinical arena (editorial). *Lancet* 1991; 338: 1560-1562.
424. Bates ER, Shenker Y, Grekin RJ. The relationship between plasma levels of immunoreactive atrial natriuretic hormone and hemodynamic function in man. *Circulation* 1986; 73: 1155-1161.
425. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, et al. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99: 169-175.
426. Van Deventer SJH, Buller HR, Ten Cate JW, et al. Endotoxemia: an early predictor of septicemia in febrile patients. *Lancet* 1988; 1: 605-608.
427. Hack CE, Nuijens JH, van Schijndel S, et al. A model for the interplay of inflammatory mediators in sepsis: a study in 48 patients. *Intensive Care Med* 1990; 16 (suppl 3): S187-S191.
428. Brandtzaeg P, Mollnes TE, Kierulf P. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989; 160: 58-65.
429. Smedegard G, Ciu L, Hugli TE. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. *Am J Pathol* 1989; 135: 489-497.
430. Haynes B, Fauci AS. The immune system, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 12th edition. Wilson, Braunwald, Isselbacher, Petersdorf, Martin, Fauci, Root, eds. McGraw Hill, N York, 1991, 83-84.
431. Hack CE, Nuijens JH, Felt-Bersma RJF, et al. Elevated plasma levels of the anaphylotoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am J Med* 1989; 86: 20-26.

432. Fernández Cruz A, Ibarra J, Reinares L, et al. Endotelina-1 en la diabetes mellitus. II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Barcelona, Octubre 1991.
433. Lam HC, Takahashi K, Ghattei MA, et al. Immunoreactive endothelin in human plasma, urine, milk and saliva. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (Suppl 7): S390-S393.
434. Kanno K, Hirata Y, Shichiri M, et al. Plasma endothelin-1 levels in patients with diabetes mellitus with or without vascular complications. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (Suppl 7): S475-S476.
435. Totsune K, Sone M, Takahashi K, et al. Immunoreactive endothelin in urine of patients with and without diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (Suppl 7): S423-S424.
436. Schwartz D. Métodos estadísticos para médicos y biólogos. Editorial Herder, Barcelona, 1988.
437. Mollnes TE. Quantification of the C3d split products of human complement by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol* 1985; 21: 607-613.
438. Matsuyama K, Yasue H, Okuruma K, et al. Increased plasma level of endothelin-1 like immunoreactivity during coronary spasm in patients with coronary spastic angina. *Am J Cardiol* 1991; 68: 991-995.
439. Kamoi K, Sudo N, Ishibashi M, Yamaji T. Plasma endothelin-1 levels in patients with pregnancy-induced hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 1486-1487.
440. Florijn KW, Derkx FHM, Visser W, et al. Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. *J Hypertens* 1991; 9 (suppl 6): S166-S167.
441. Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1711-1716.
442. Clark BA, Halvorson L, Sachs B, Epstein FH. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 962-968.
443. Nisell H, Wolff K, Hemsén A, et al. Endothelin, a vasoconstrictor important to the uteroplacental circulation in pre-eclampsia. *J Hypertens* 1991; 9 (suppl 6): S168-S169.
444. Roberts JM; Taylor RN, Musci TJ, et al. Pre-eclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1200-1204.
445. Lundblom B, Lundberg JM, Lunell JO, et al. Endothelin: a potent constrictor of small myometrial arteries of term pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 62: 235-237.

446. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD. Preliminary evidence for homeostatic mechanism regulating endothelin production in pre-eclampsia. *Lancet* 1991; 337: 943-945.
447. Iwata I, Takagi K, Yamaji K, Tanizawa O. Increase in the concentration of immunoreactive endothelin in human pregnancy. *J Endocrinol* 1991; 129: 301-307.
448. Nakamura T, Kasai K, Konuma S, et al. Immunoreactive endothelin concentrations in maternal and fetal blood. *Life Sci* 1990; 46: 1045-1050.
449. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, et al. Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986; 55: 455-462.
450. Watschinger B, Vychtil A, Schuller M, et al. The pathophysiologic role of endothelin in acute vascular rejection after renal transplantation. *Transplantation* 1991; 52: 743-745.
451. Edwards BS, Hunt SA, Fowler MB, et al. Effect of cyclosporine on plasma endothelin levels in humans after cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1991; 67: 782-784.
452. Uchihara M, Izumi N, Sato C, Marumo F. Clinical significance of elevated plasma endothelin concentration in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16: 95-99.
453. Schrader J, Tebbe U, Borries M, et al. Plasma endothelin in normal persons and in patients with various diseases. *Klin Wochenschr* 1990; 68: 774-779.
454. Veglio F, Pinna G, Melchio R, et al. Plasma endothelin levels in cirrhotic patients. *J Hepatol* 1992; 15: 85-87.
455. Siegler RL, Edwin SS, Christofferson RD, Mitchell MD. Endothelin in the urine of children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics* 1991; 88: 1063-1065.
456. Loscalzo J. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 117-119.
457. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-75.
458. Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW. Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 32-37.
459. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, et al. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1374-1379.
460. Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, Rouleau JL. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992; 85: 510-517.

461. Chester AH, O'Neill GS, Allen SP, et al. Effect of endothelin on normal and diseased human coronary arteries. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 210-213.
462. Takahashi K, Suda K, Lam HC, et al. Endothelin-like immunoreactivity in rat models of diabetes mellitus. *J Endocrinol* 1991; 130: 123-127.
463. Vijayaraghavan J, Scili AG, Carretero OA, et al. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11. (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; 265: 14150-14155.
464. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 1992; 20: 89-95.
465. Ota K, Kimura T, Shoji M, et al. Interaction of ANP with endothelin on cardiovascular, renal, and endocrine function. *Am J Physiol* 1992; 262: E135-E141.
466. Lerman A, Sandok, Hildebrand FL, Burnett JC. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation* 1992; 85: 1894-1898.
467. Dohi Y, Hahn AWA, Boulanger CM, et al. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992; 19: 131-137.
468. Dzau VJ, Gibbons GH. Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 1991; 18 (suppl III): III115-121.
469. Packer M. Pathophysiology of chronic heart failure. *Lancet* 1992; 340: 88-92.
470. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 14613-14616.
471. Minkes RK, Higuera TC, Rogers GF, et al. Cardiovascular responses to vasoactive intestinal contractor, a novel endothelin-like peptide. *Am J Physiol* 1990; 259: H1152-1160.
472. Ishida N, Tsujioka K, Tomoi M, et al. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. *FEBS-Lett* 1989; 247: 337-340.
473. Resink TJ, Scott-Burden T, Bühler FR. Activation of phospholipase A2 by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 158: 279-286.
474. Pinels V, Longchamp MO, Chabrier PE, Braquet P. Na⁺/K⁺ antiport activation by endothelin and phorbol ester in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 1990; 4: 403.

475. Chabrier PE, Braquet P. Endothelin. *Horm Res* 1990; 34: 169-174.
476. González Quijada S. Endotelina e hipertensión arterial. Tesis de Licenciatura, Universidad Complutense, Madrid. 1992.
477. Lüscher FT, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19:117-130.
478. Katusic ZS, Sheperd JT. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension* 1991; (suppl III): III86-92.
479. Moore K, Wendon J, Frazer M, et al. Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327: 1774-1778.
480. Epstein M. Hepatorenal syndrome-newer perspectives. *N Engl J Med* 1992; 327: 1810-1811.

FIGURAS

ENDOTELINA EN CIRUGIA VASCULAR. CARACTERISTICAS CLINICAS.

Numero de pacientes: 13. 12 varones, 1 mujer.

Edad: 67 ± 13 .

Diagnostico: Obstrucción aórtica por ateromatosis.

Procedimiento quirúrgico:

Colocación de una prótesis vascular aórtica.

Clampaje infrarrenal de la aorta.

Factores de riesgo cardiovascular:

Diabetes 5 (38%)

Tabaquismo 8 (61%)

Hipertensión arterial 4 (30%)

Hiperlipemia 3 (23%)

FIGURA A1

ENDOTELINA-CIRUGIA VASCULAR

Efecto del clampaje aórtico infrarrenal

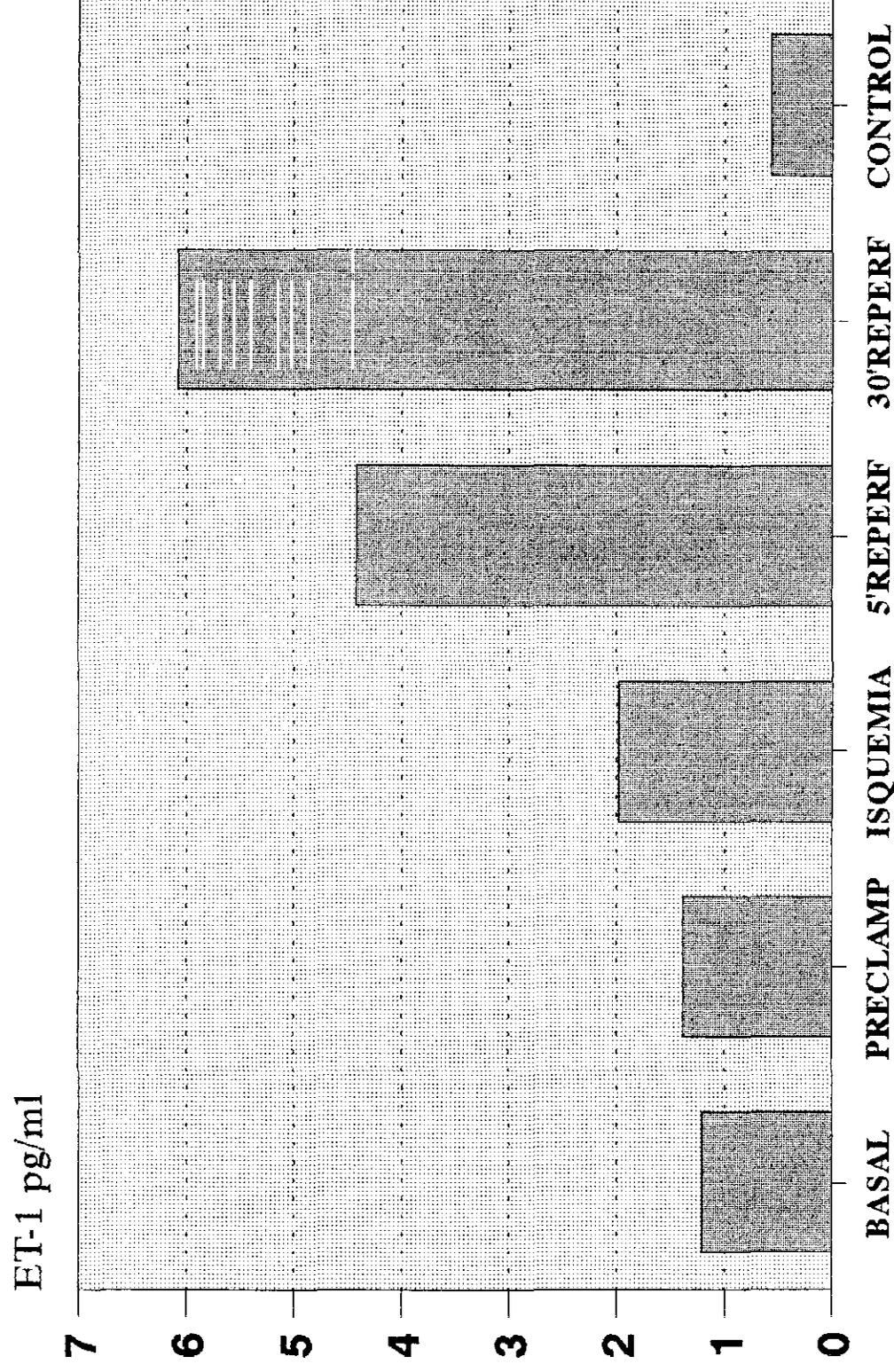


FIGURA A2

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE.

Características clínicas.

Número de pacientes: 7

Edad: 56 ± 9 años.

Sexo: 6 varones, 1 mujer.

Factores de riesgo:

Tabaquismo 71%

Hipertensión arterial 42%

Hiperlipemia 42%

Diabetes 42%

Manifestaciones clínicas:

Angina de reposo (4)

Angina de reciente comienzo (2)

Angina acelerada (1).

FIGURA B1a

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE.

Características clínicas.

Lesión única en la DA: 100%.

Estenosis pre-ACTP: 82.8%

Estenosis post-ACTP: 33.7%.

Morfología de la lesión:

Focal 4

Tubular 2

Difusa 1

Apariencia de la lesión:

Excéntrica 5

Concéntrica 2

FIGURA B1b

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE/ACTP. Arteria coronaria

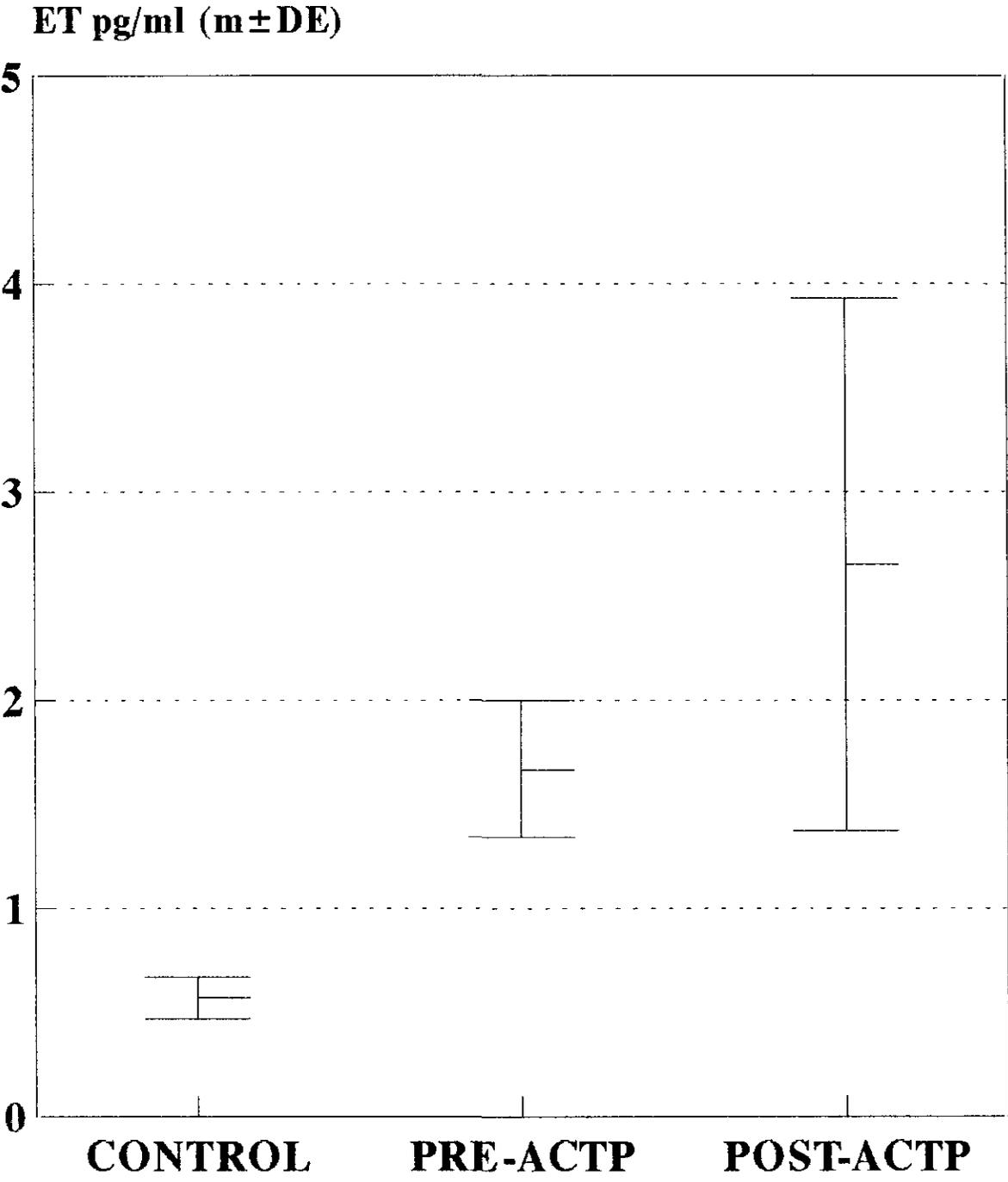


FIGURA B2

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE/ACTP

Seno coronario

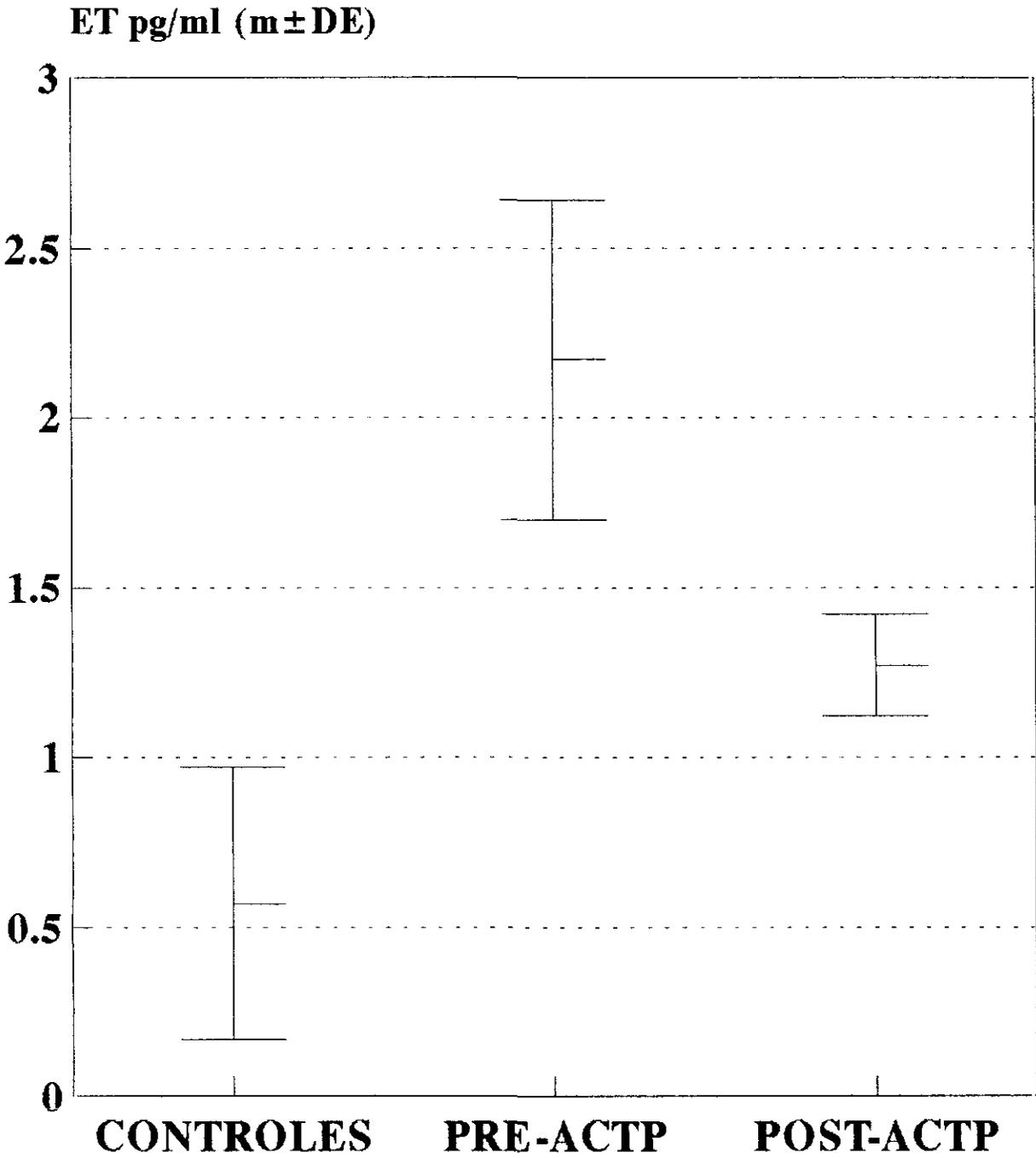


FIGURA B3

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE/ACTP

Arteria femoral

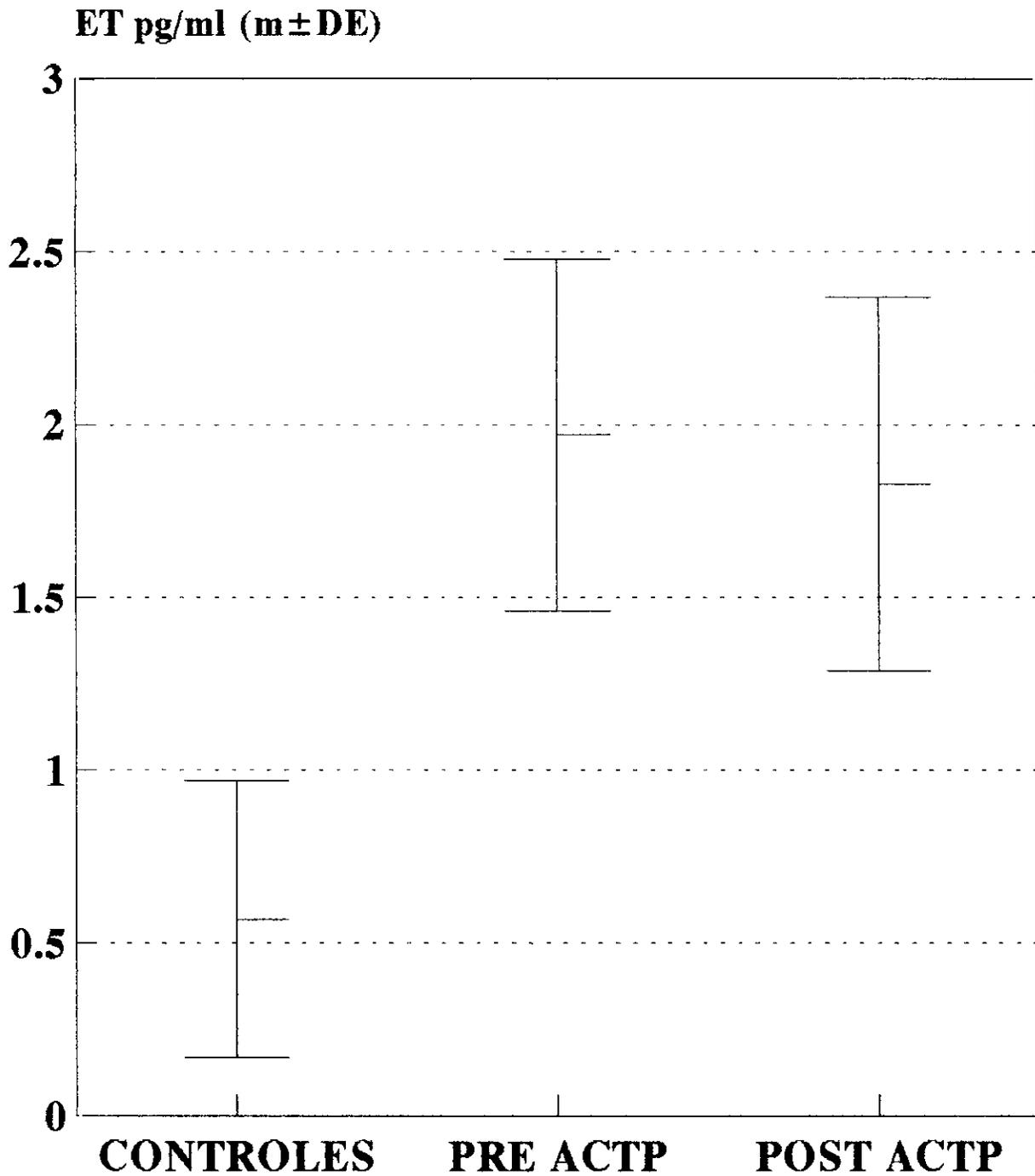


FIGURA B4

ENDOTELINA-ANGINA INESTABLE/ACTP

Vena femoral

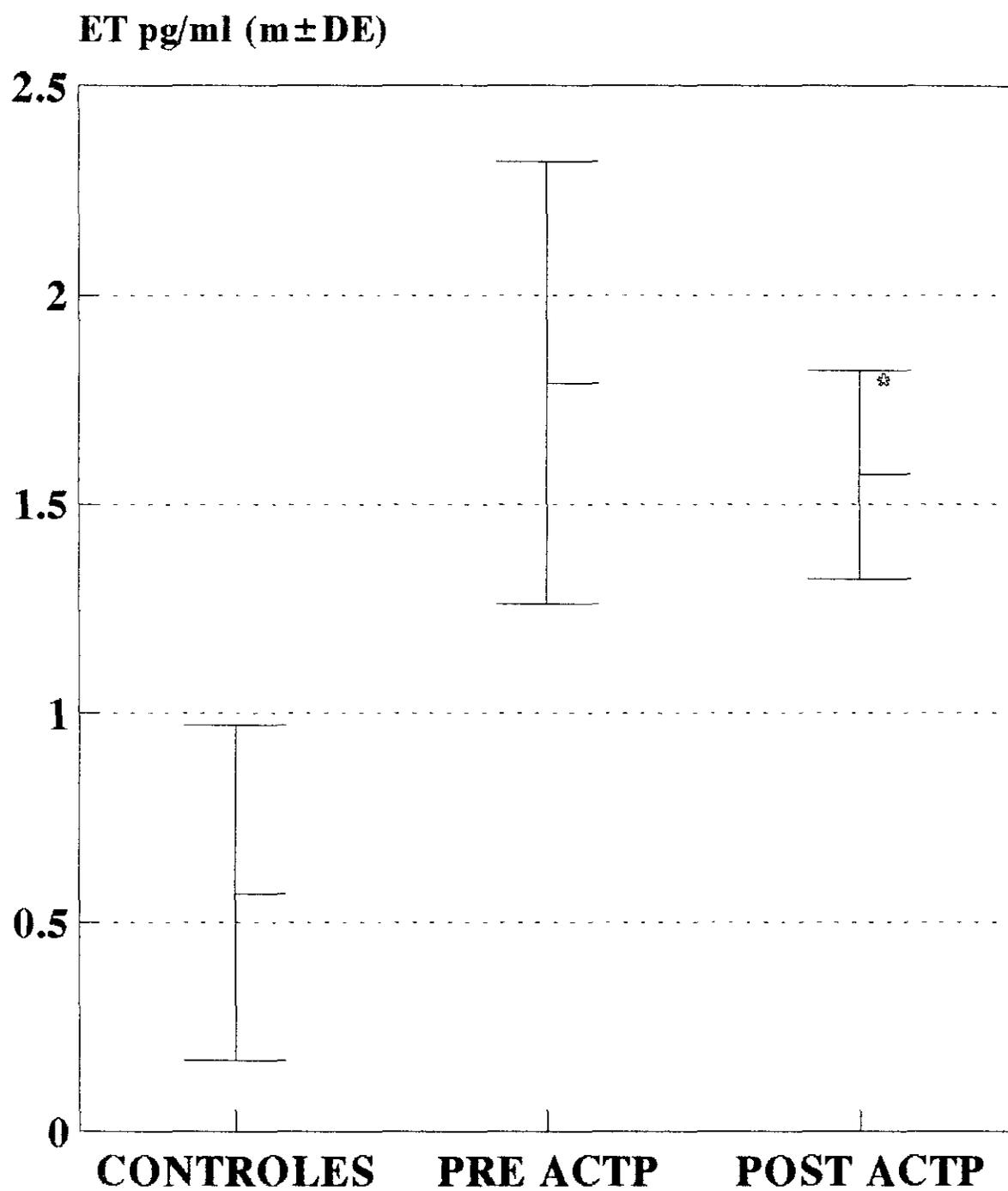


FIGURA B5

ENDOTELINA-INFARTO DE MIOCARDIO.

Características clínicas.

Número de pacientes: 13; varones 7, mujeres 3.

Edad: 57 ± 9 años.

F. de riesgo:

Tabaquismo (7).

Hipertensión (3).

Hiperlipemia (3).

Diabetes (2).

Horas de evolución antes del ingreso: 3.6 ± 2.2 .

Pico máximo de CPK: 1194 ± 801 mg/dl. Hora: 17.7.

Localización:

Inferior (4).

Anteroseptal (4).

Anterolateral (2).

Tratamiento:

No fibrinólisis (4).

Estreptoquinasa iv.(4).

r-TPA iv.(2).

FIGURA C1.

ENDOTELINA-IAM

Niveles plasmaticos de ET-1

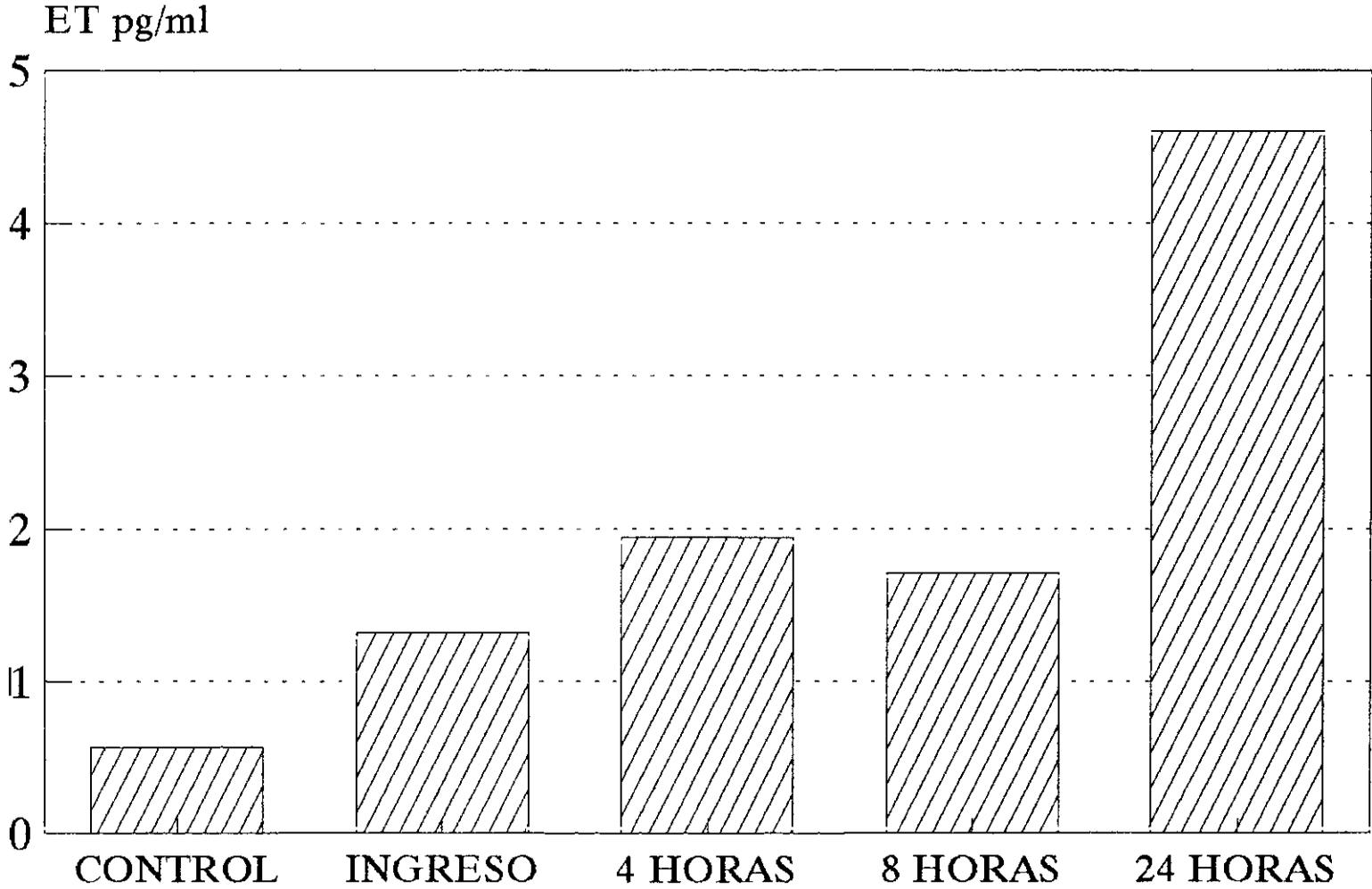


FIGURA C2

ENDOTELINA-IAM

Niveles plasmáticos de ANF

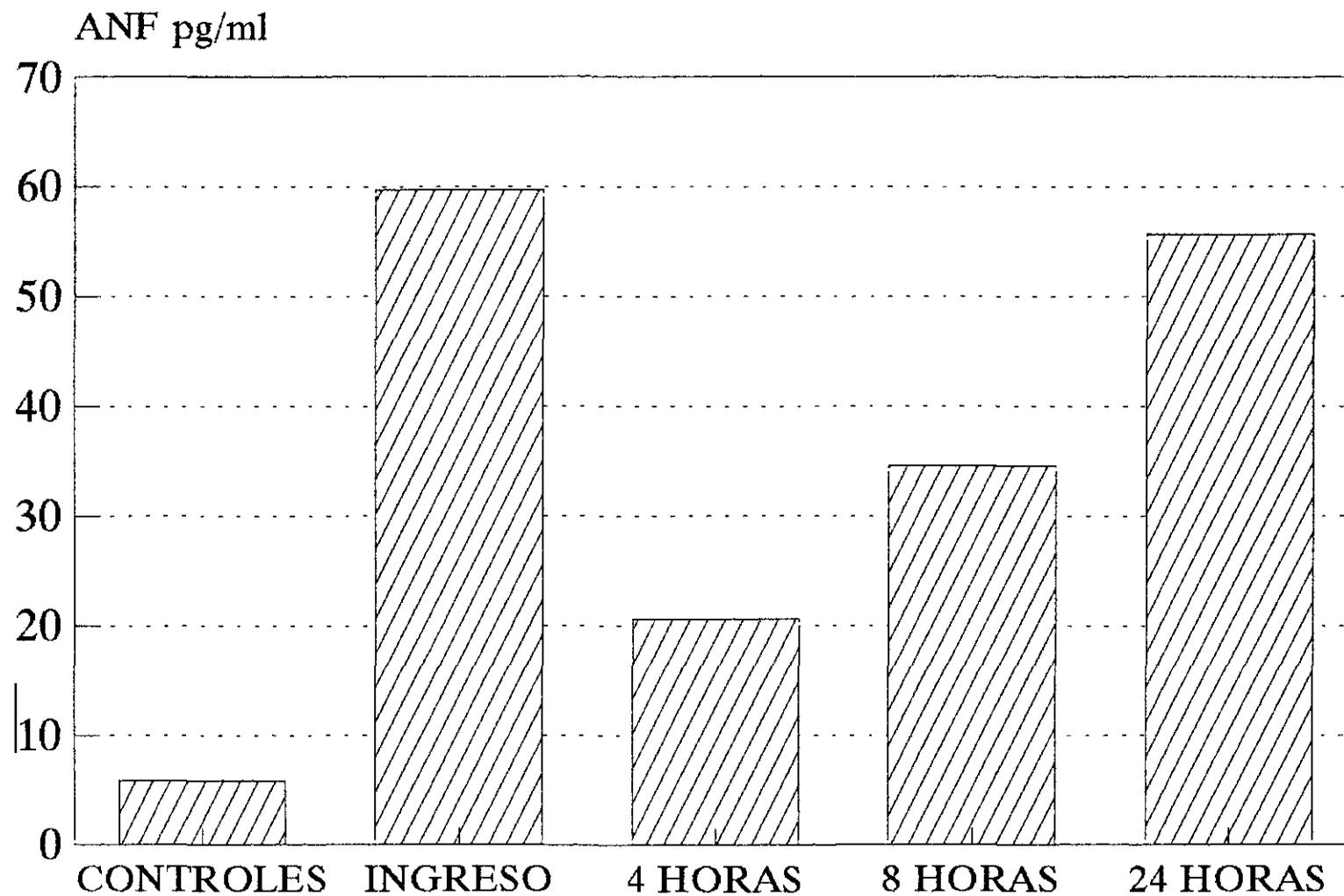


FIGURA C3

ENDOTELINA-IAM

Niveles plasmáticos de CRA

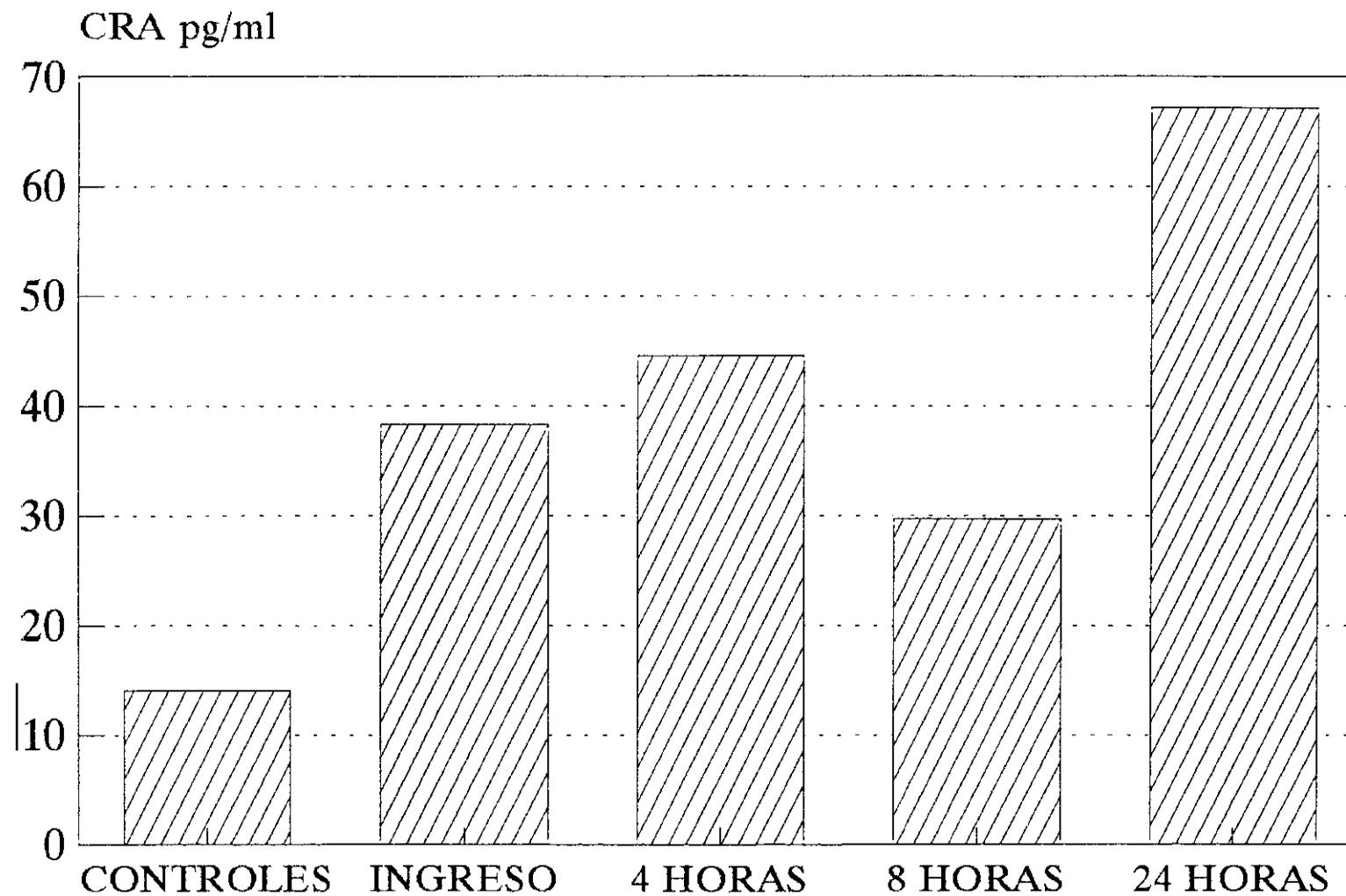


FIGURA C4

ENDOTELINA-IAM

Efecto de la fibrinólisis.

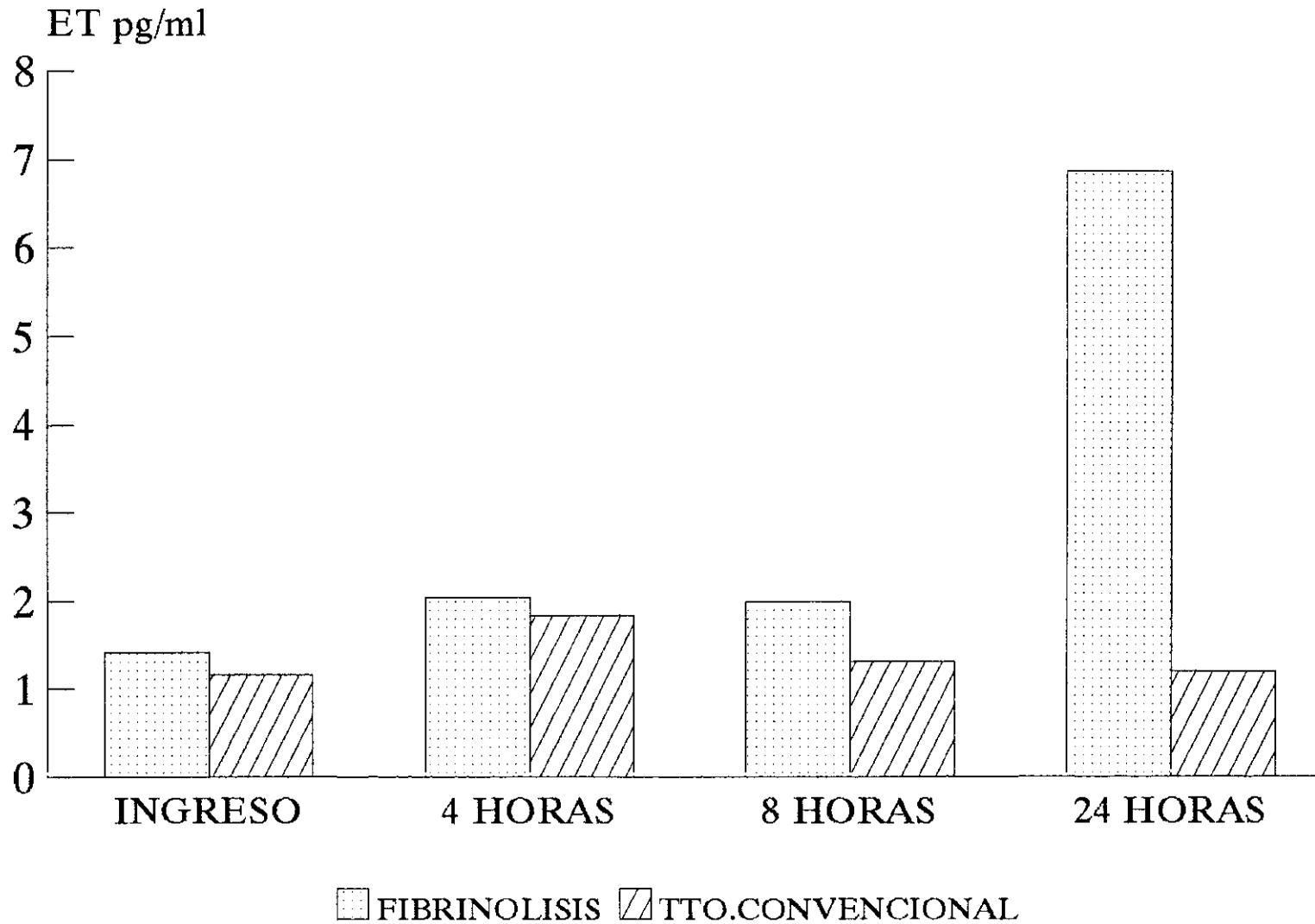


FIGURA C5

ENDOTELINA-IAM

Correlación ET-CRA

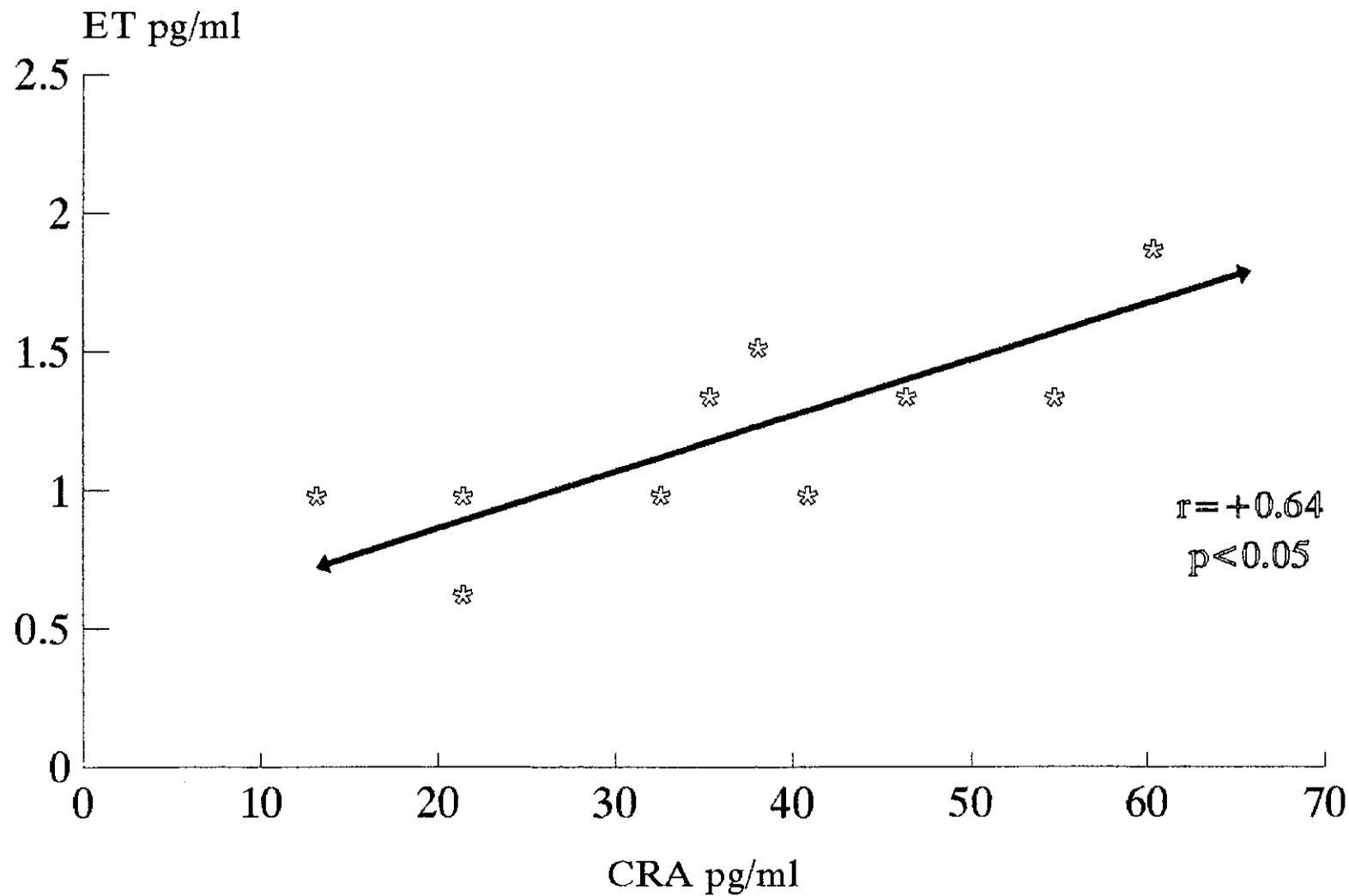


FIGURA C6

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO.

Escala de Mathew modificada.

A/ Situación mental

1. Nivel de conciencia (0–8)
2. Orientación (0–6)

B/ Lenguaje (0–23)

C/ Pares craneales

1. Hemianopsia homónima (0–3)
2. Desviación conjugada de los ojos (0–3)
3. Debilidad facial (0–3)

D/ Fuerza en extremidades

- Por cada miembro (0–5)

E/ Capacidad global (0–28)

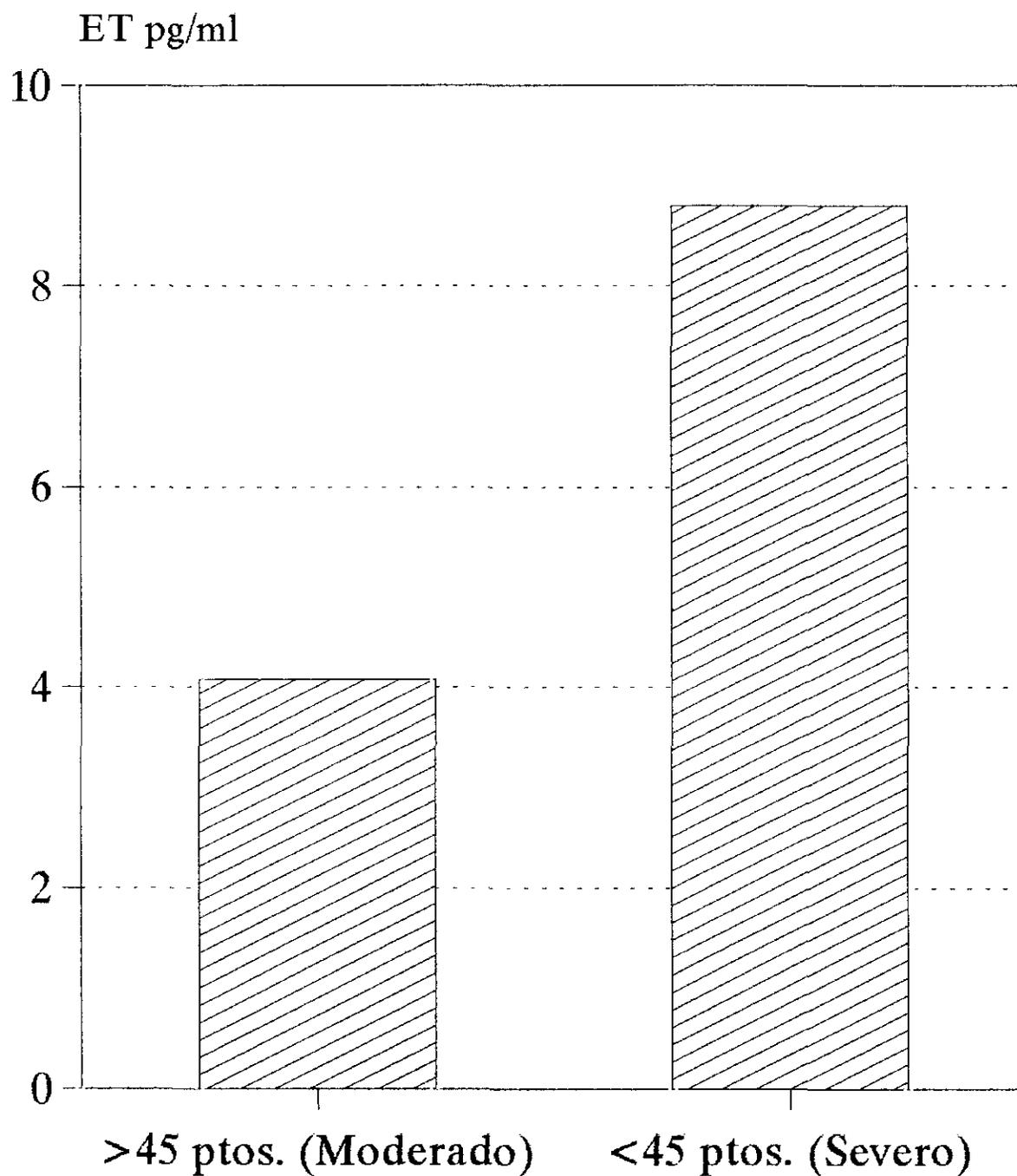
F/ Reflejos (0–3)

G/ Sensibilidad (0–3)

FIGURA D1.

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

ET como marcador de severidad clínica



Escala de Mathew

FIGURA D2

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Correlacion lineal ANF-IMR

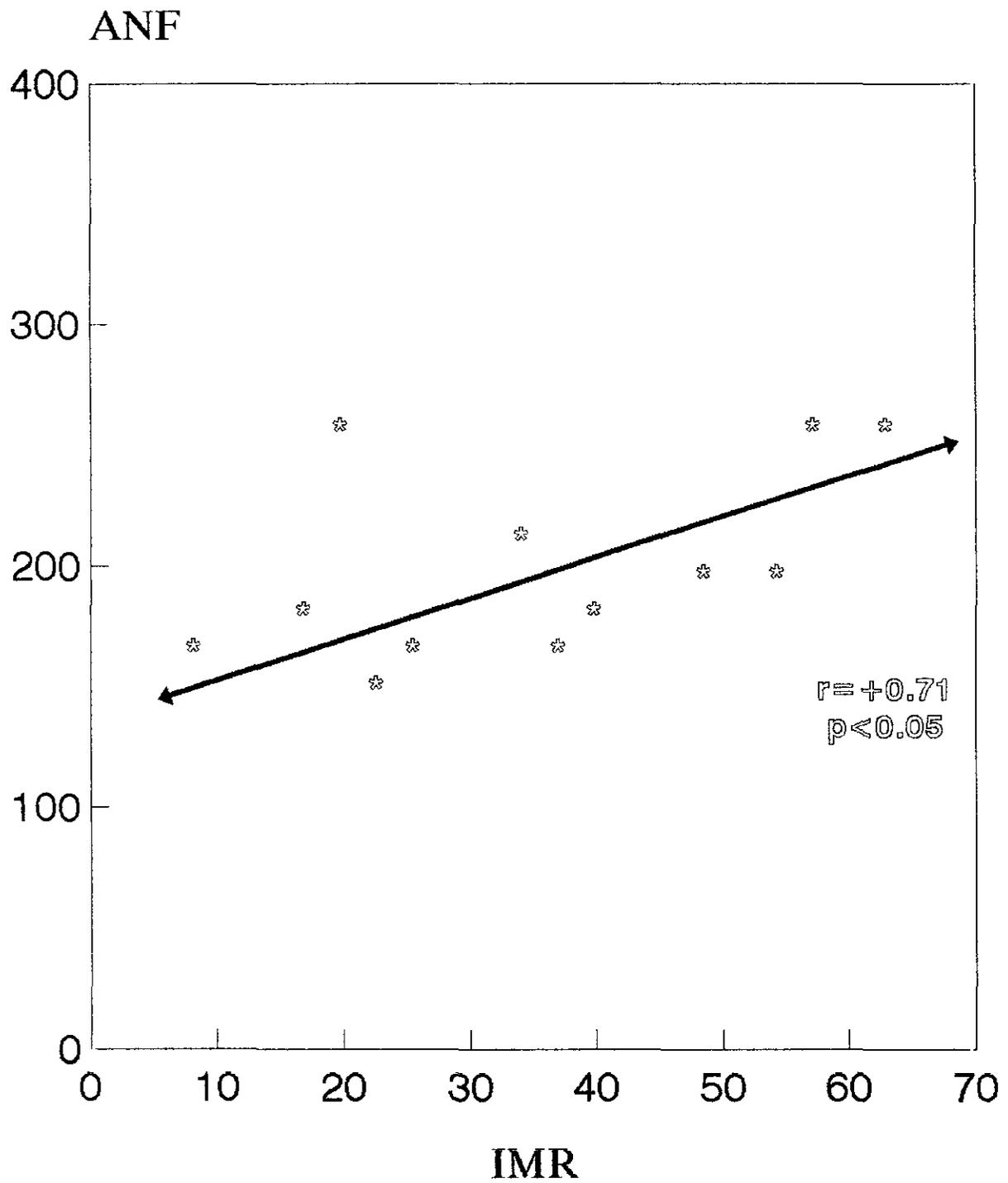


FIGURA D3

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Correlación lineal TAD-IMR

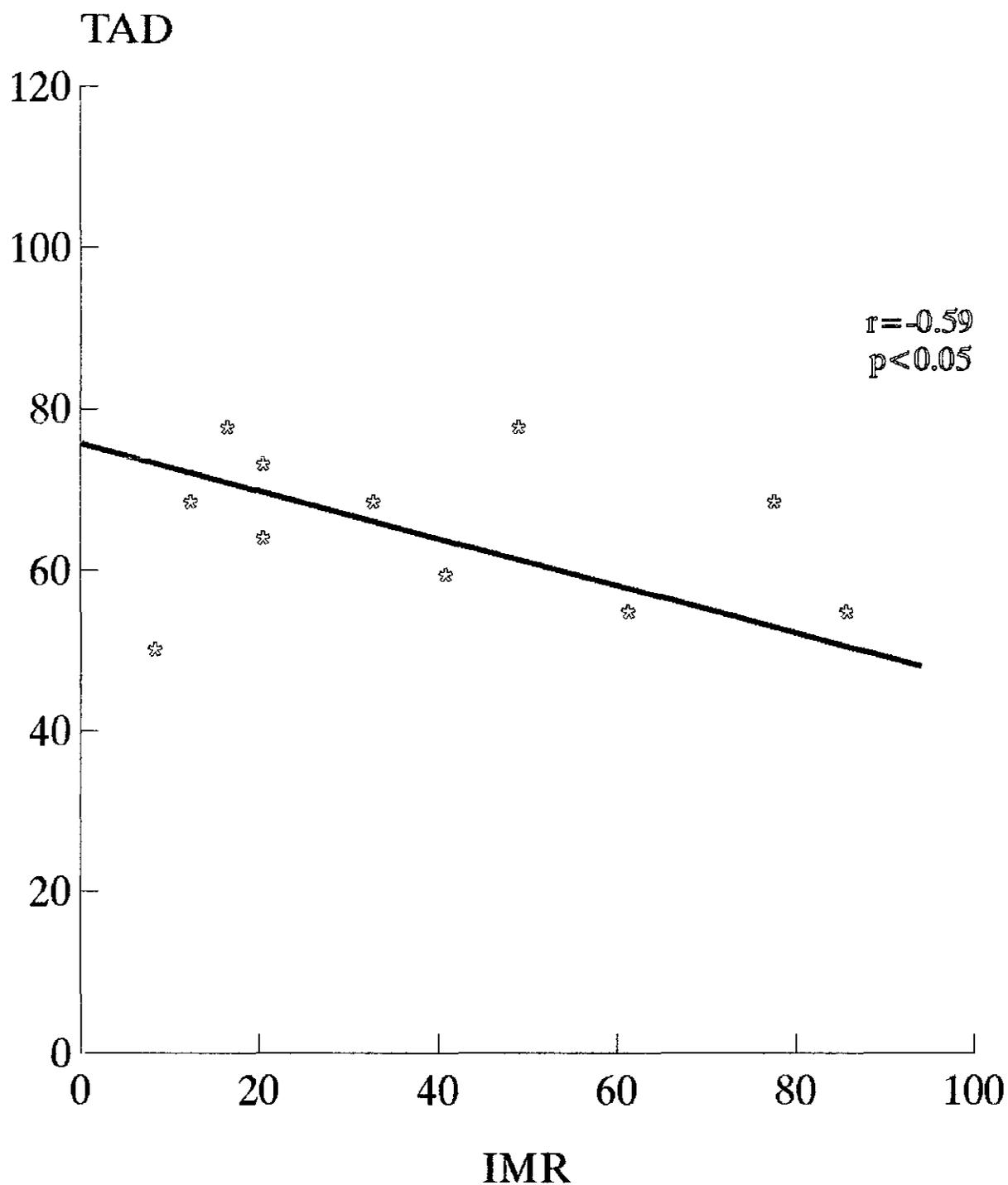


FIGURA D4

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Escala de Mathew

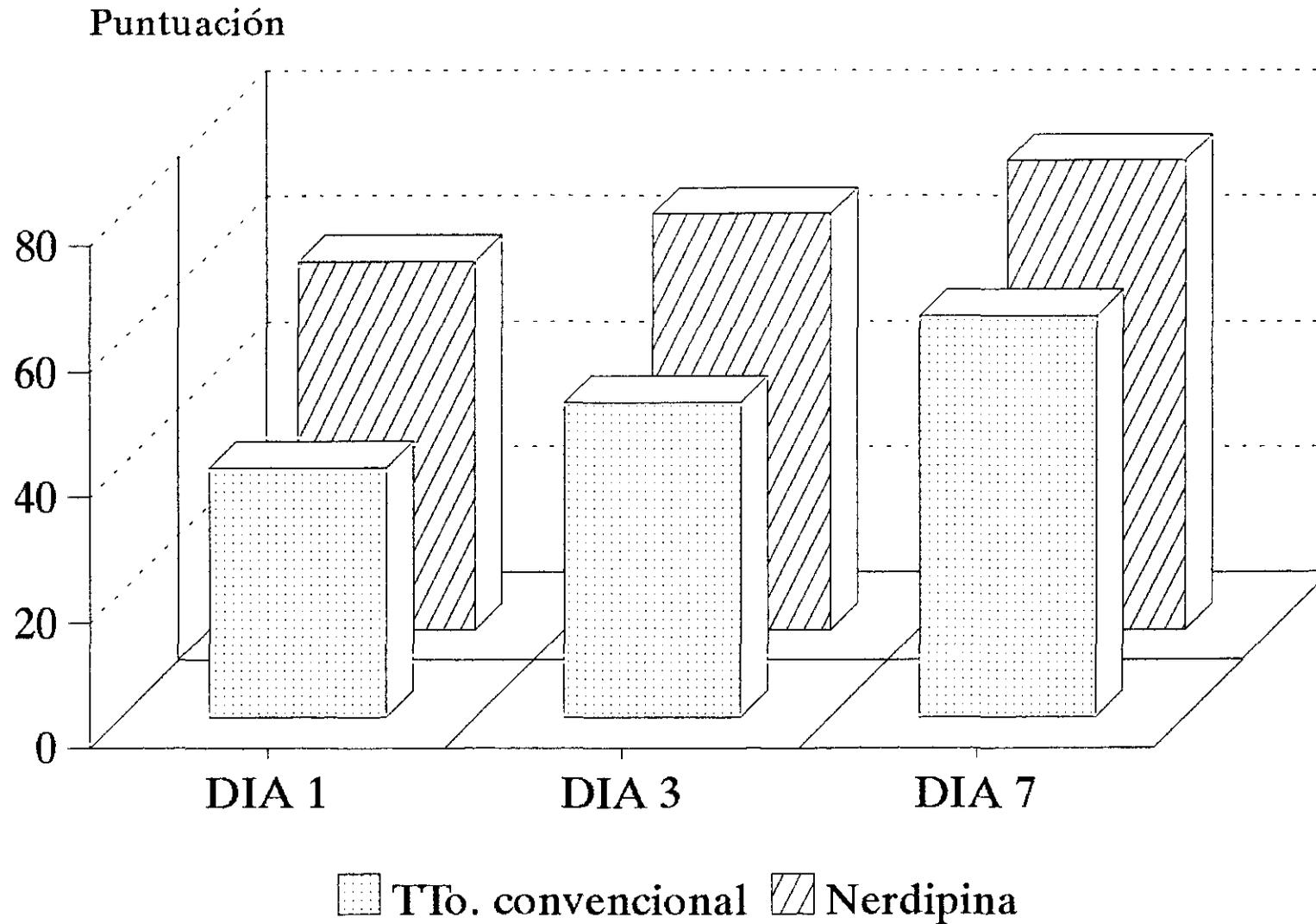


FIGURA D5

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Valores de ET (Tto.convencional)

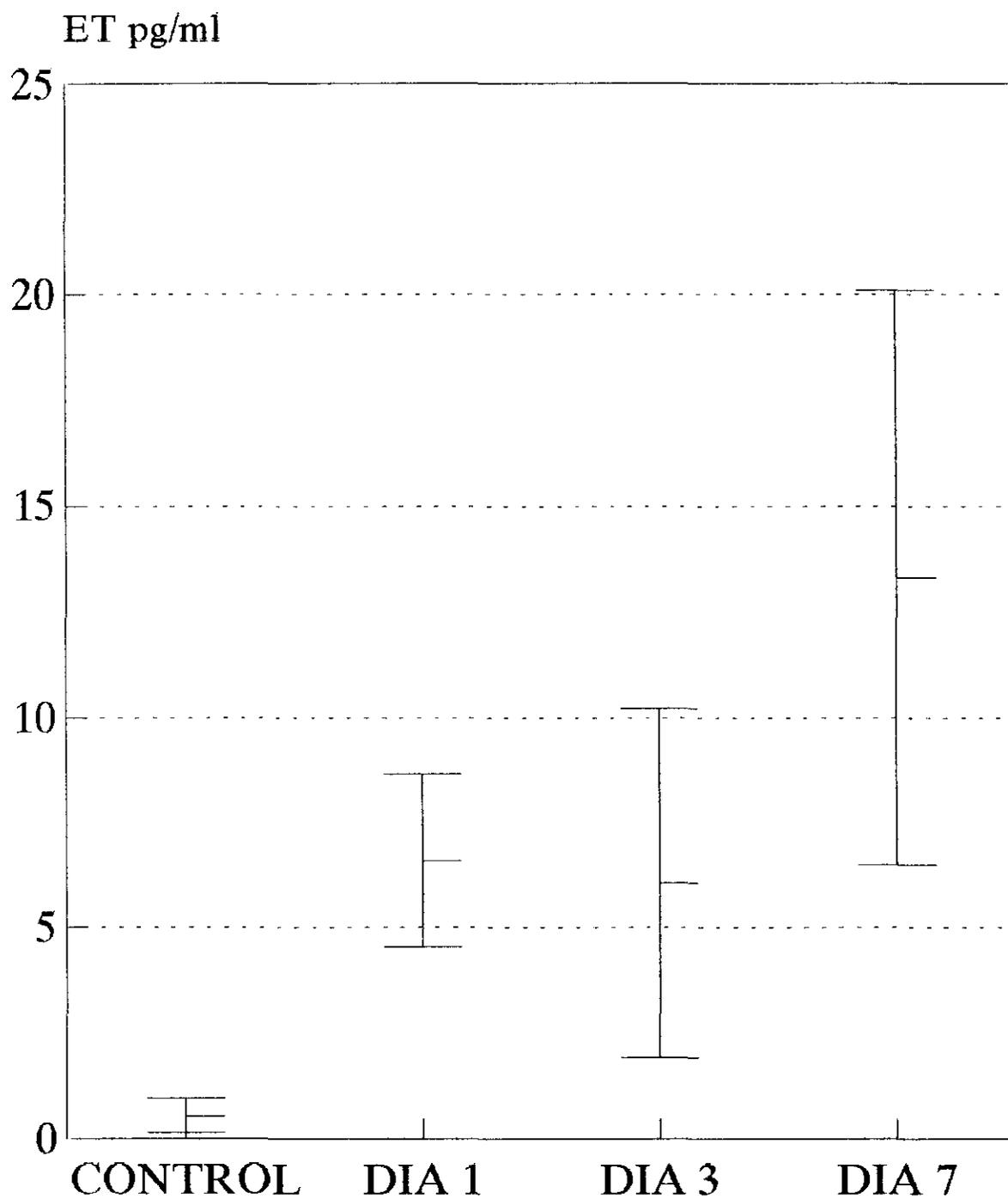


FIGURA D6

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Valores de CRA y ANF.

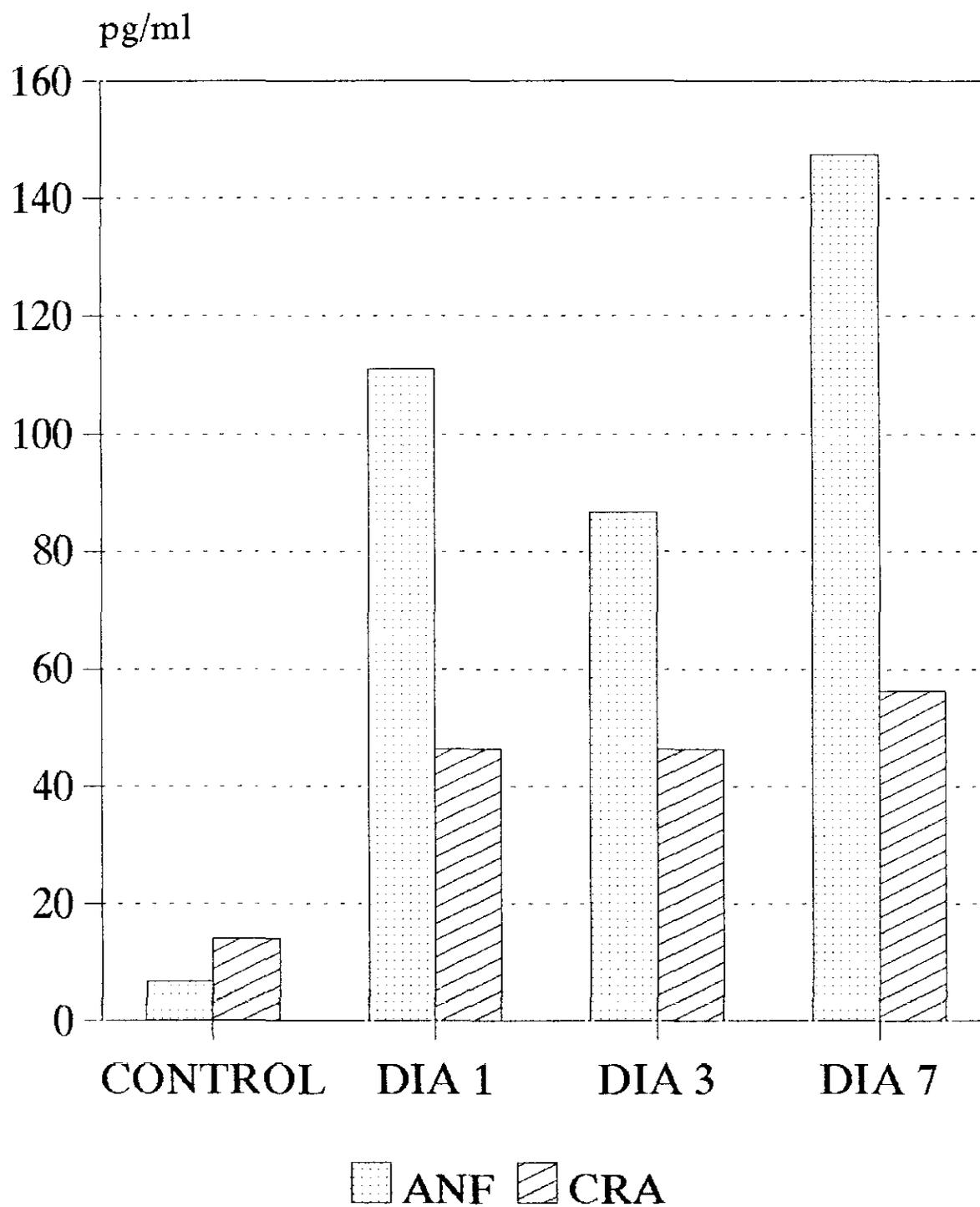


FIGURA D7

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Efecto del tratamiento en la evolución.

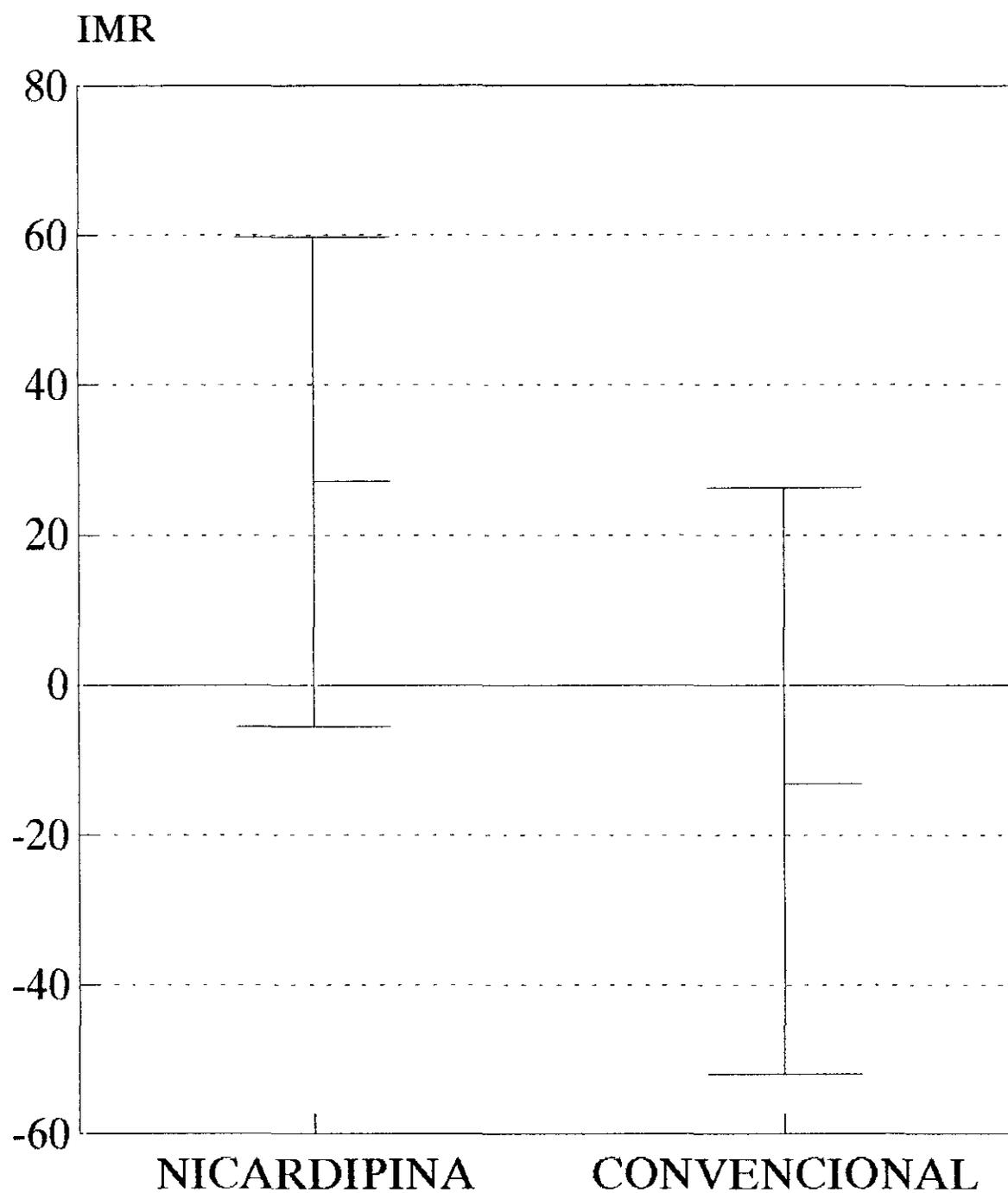


FIGURA D8

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Endotelina como marcador pronóstico.

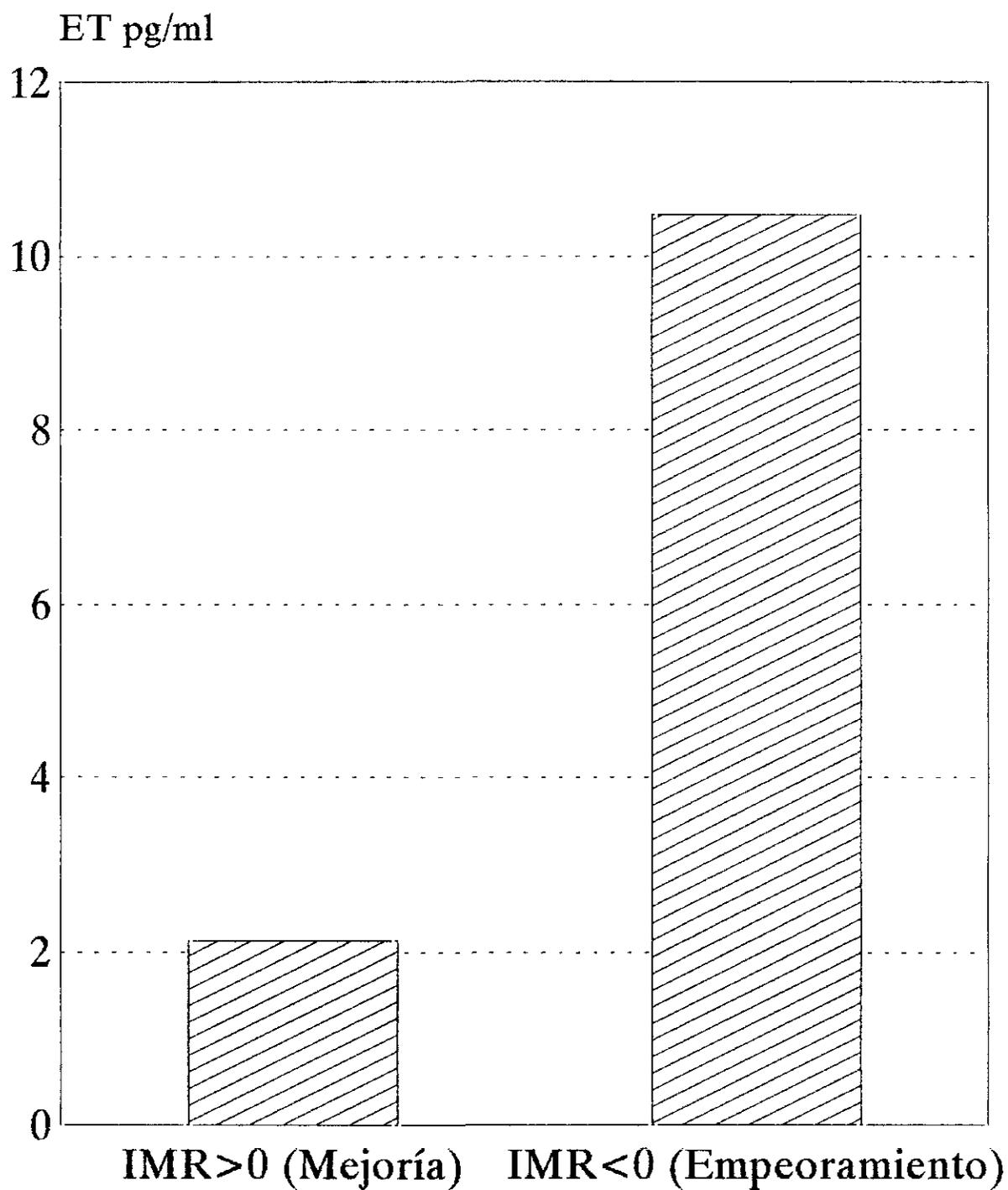


FIGURA D9

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO

Valores de ET (Tto. Nicardipina).

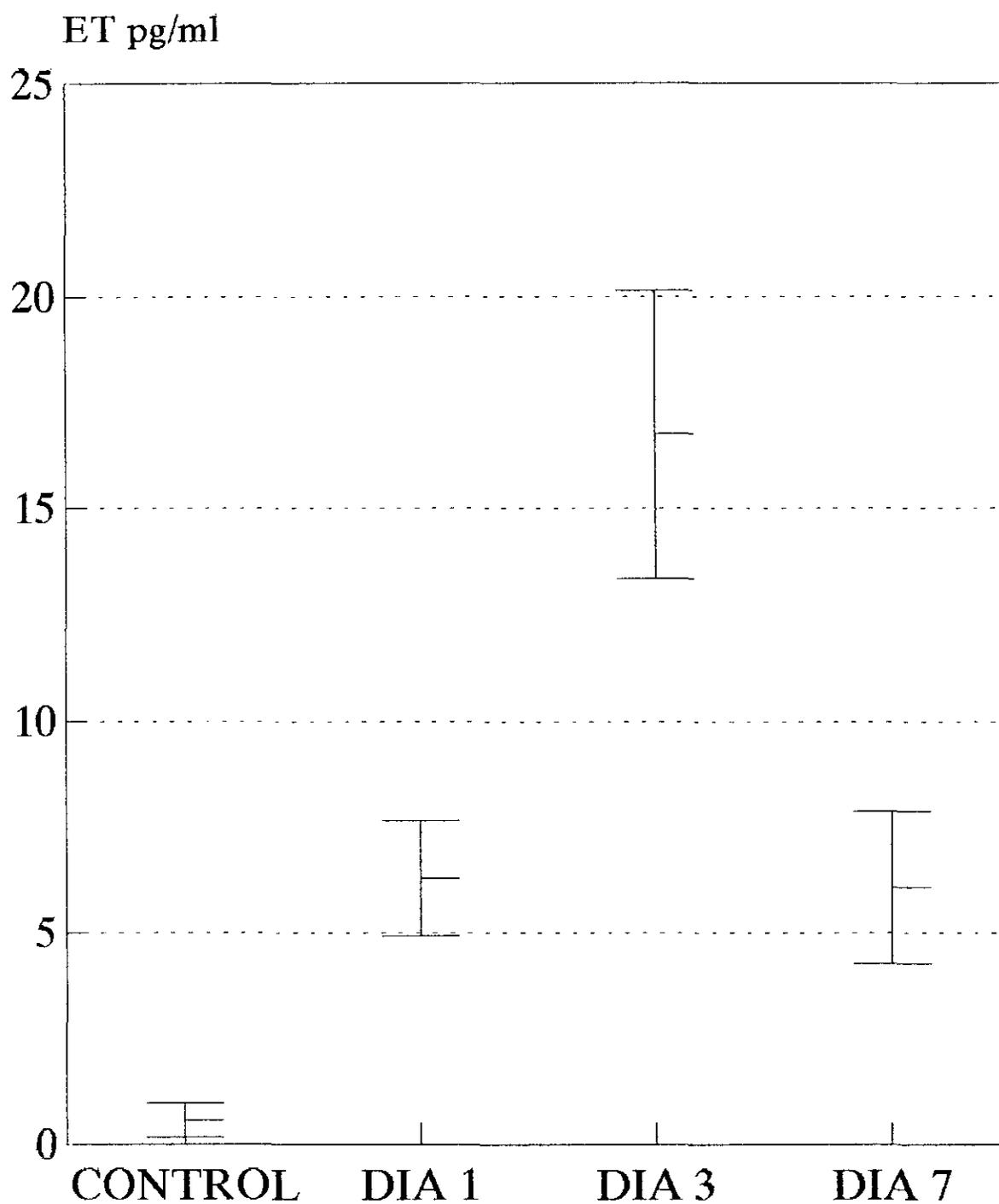


FIGURA D10

ENDOTELINA-ACV ISQUEMICO
Diferencias entre los 2 grupos.

| | | NICARDIPINA | CONVENCIONAL |
|-----------|----------|-------------|--------------|
| Edad: | (p=ns) | 73.5 ± 10 | 73.5 ± 7 |
| Sexo: | (p=ns) | 5/4 | 5/3 |
| Mathew 1: | (p=ns) | 39.7 ± 18 | 58.7 ± 23 |
| TAS: | (p=ns) | 151 ± 20 | 147 ± 29 |
| TAD: | (p=ns) | 92 ± 23 | 82 ± 13 |
| IMR: | (p<0.05) | +27.08 ± 12 | -13.09 ± 38 |
| ET: | (p=ns) | 6.16 ± 5.8 | 6.28 ± 3.8 |
| ANF: | (p=ns) | 97.2 ± 115 | 167 ± 135 |
| CRA: | (p=ns) | 50.47 ± 49 | 20.87 ± 12 |
| Exitus: | (p<0.05) | 12.5% | 55.6% |

FIGURA D11

ENDOTELINA EN LA SEPSIS

Etiología de la infección.

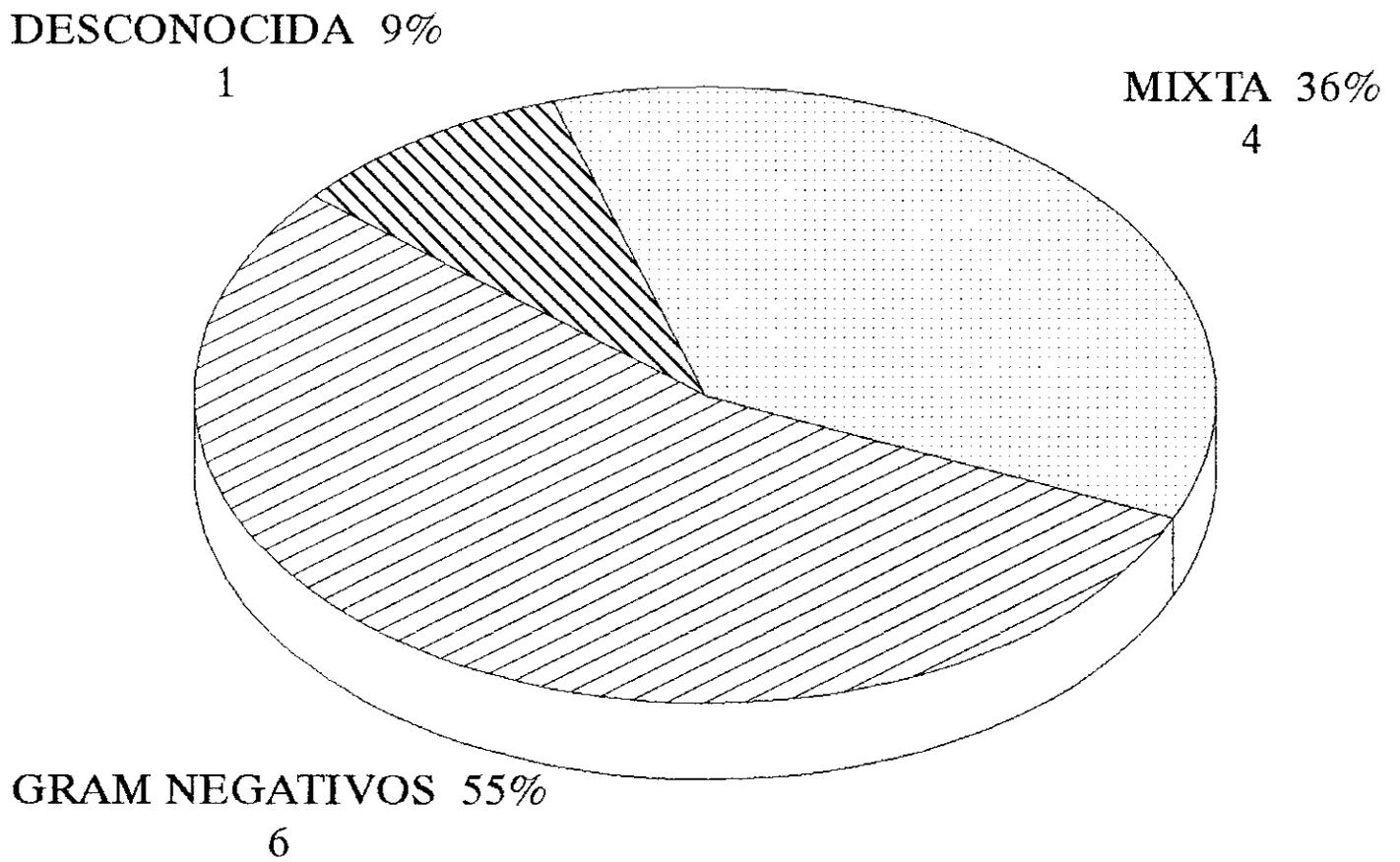


FIGURA E1

ENDOTELINA EN LA SEPSIS

Características clínicas.

| | |
|---------------------|------------------------|
| 11 enfermos | 9 varones, 2 mujeres |
| Edad | 46.81 ± 19 Años. |
| Síndrome séptico | 4 (36%) |
| Shock séptico | 7 (63%) |
| Puntuación Apache-2 | 23.63 ± 7.5 Puntos. |
| Puntuación SSS | 17.45 ± 4.59 Puntos. |
| Aminas vasoactivas | 7 pacientes (63.6%) |
| Creatinina | 2.85 ± 2.24 mg/dl. |
| pO ₂ | 89.16 ± 28.6 mmHg. |
| DAaO ₂ | 515.4 ± 144 mmHg. |
| F. cardíaca | 113.6 ± 16.4 lats/min. |
| Exitus | 4 (36%) |

FIGURA E2

ENDOTELINA EN LA SEPSIS

Niveles plasmáticos de ET-1

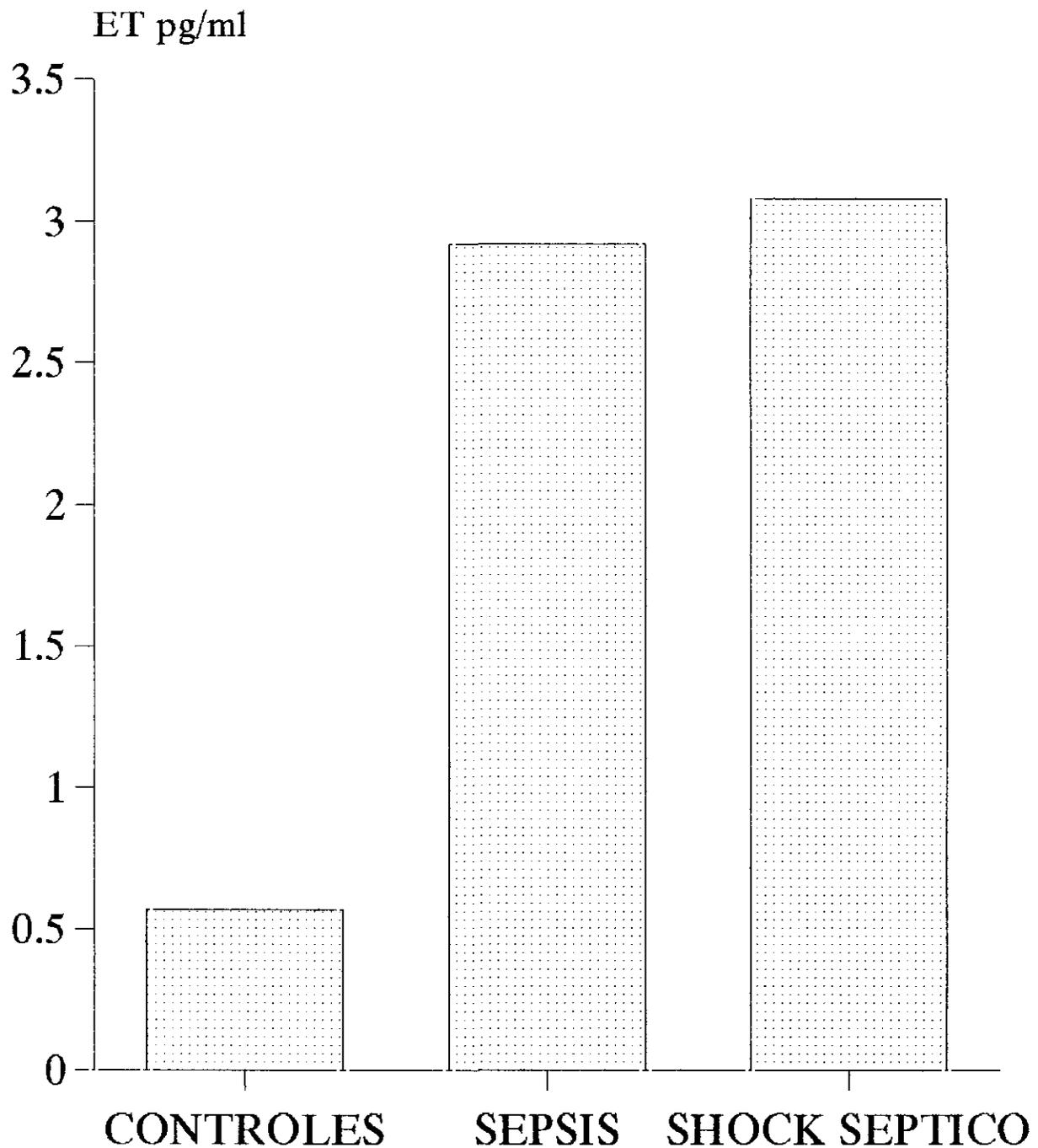


FIGURA E3

ENDOTELINA-SEPSIS

Correlación lineal ET-ANF

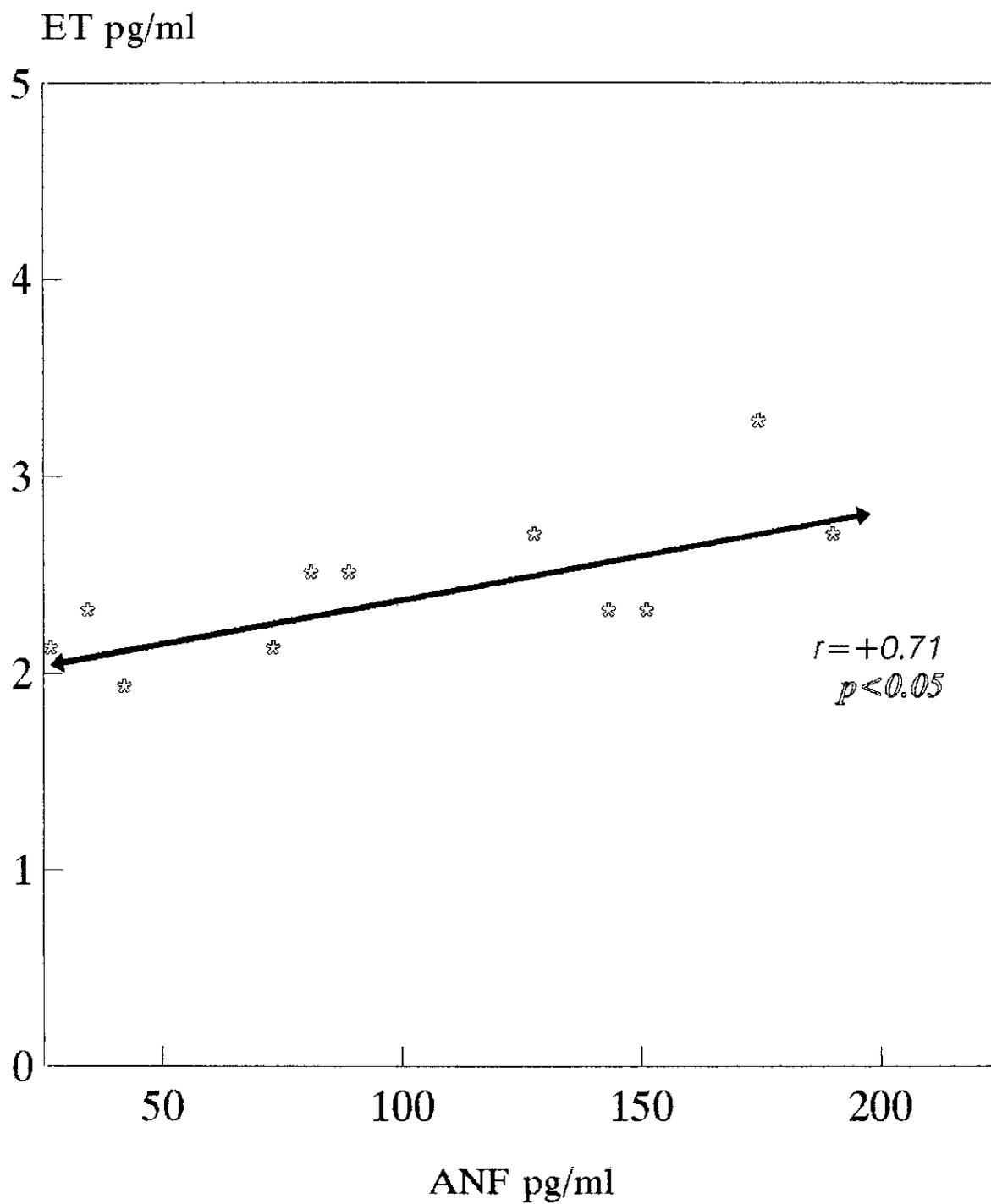


FIGURA E4

ENDOTELINA EN LA SEPSIS

Valores plasmáticos de ANF

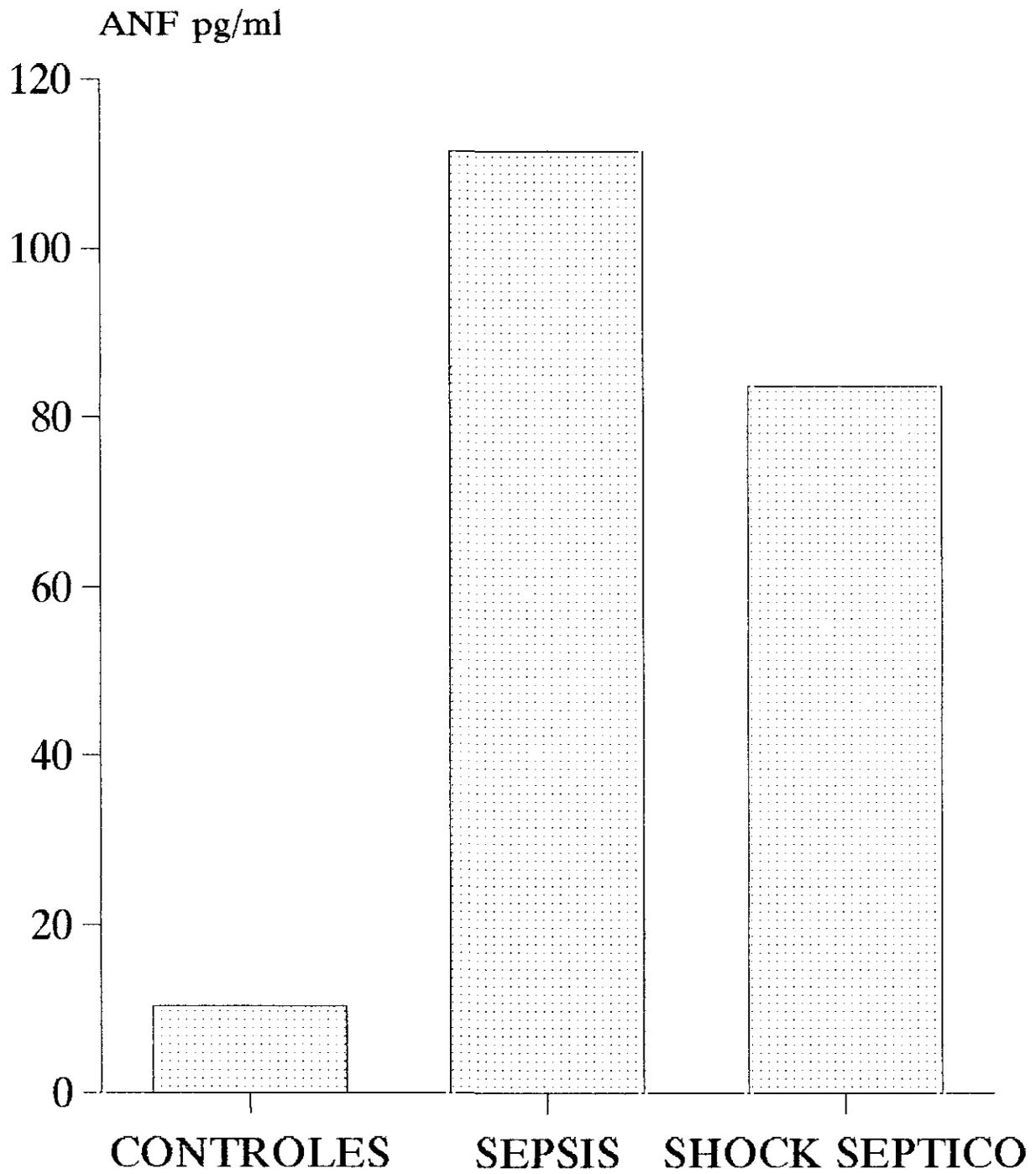


FIGURA E5

ENDOTELINA-SEPSIS

Valores plasmáticos de C3d

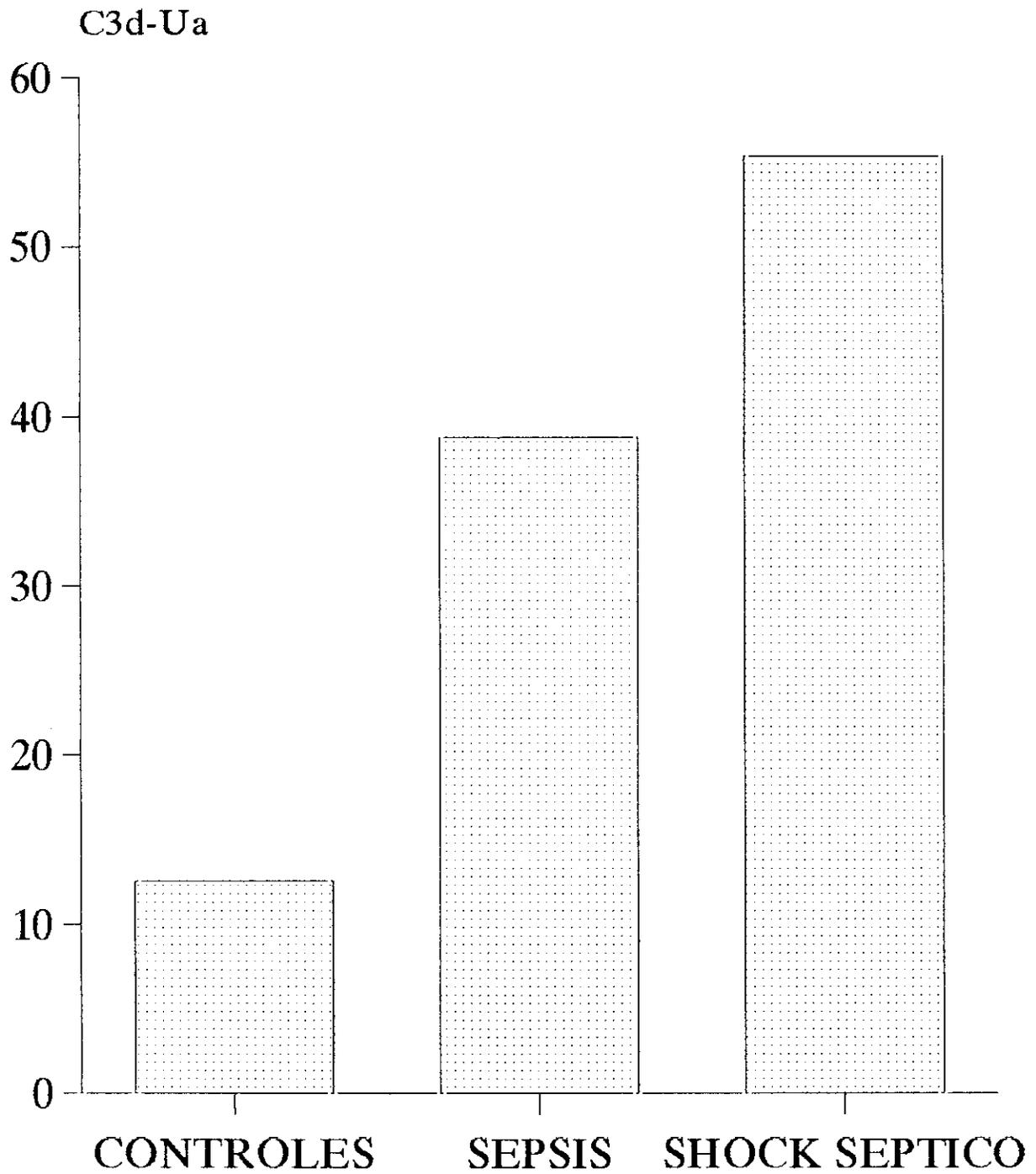


FIGURA E6