

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**REGULACION COLINERGICA Y ENDOTELIAL DE LA CIRCULACION
CORONARIA DE RESISTENCIA**

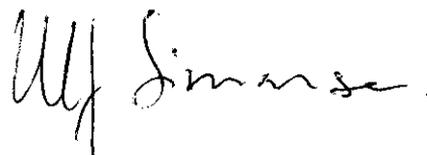
**REGULACION COLINERGICA Y ENDOTELIAL DE LA CIRCULACION
CORONARIA DE RESISTENCIA**

MEMORIA presentada para
aspirar al Grado de Doctor en
Medicina por el Licenciado D.
Ulf Simonsen.

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO
REALIZADA BAJO LA DIRECCION
DE: Prof. Dr. Albino García Sacristán



Licenciado D. Ulf Simonsen,
aspirante al Grado de Doctor en
Medicina



Madrid, Septiembre de 1994

A Dolores

*Nuestras horas son minutos
cuando esperamos saber,
y siglos cuando sabemos
lo que se puede aprender.*

A. Machado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Albino García Sacristán, por la dirección de esta tesis, así como por su entusiasmo, estímulo y confianza, poniendo a mi alcance los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Al Prof. Dr. Francisco Mora Teruel, mi tutor, por su ayuda y apoyo incondicional, que han facilitado la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Dres. Gonzalo Costa, Angeles García-Pascual, Medardo Hernández, Miguel Isla, Alicia Labadía, Dolores Prieto, Luis Rivera, Iñigo Sáenz de Tejada y Domingo Triguero por su apoyo, ayuda y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis antiguos compañeros y amigos del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Aarhus (Dinamarca) y a los miembros del European Working Party on Resistance Artery Disease (EURAD), y en especial al Prof. Michael J. Mulvany con quien inicié mis primeros e importantes pasos en la investigación y cuyo apoyo y dirección me ha llevado hasta aquí.

A D. Manuel Perales y D. Francisco Puente por su ayuda eficaz y constante.

A la Dra. Elisia Veiga por su colaboración y amabilidad al permitirme utilizar las instalaciones del Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria (U.C.M).

A la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido una Beca Predoctoral de Formación del Personal Investigador.

A los Servicios Veterinarios del Matadero Municipal de Madrid que nos han proporcionado amablemente el material biológico.

A mis amigos y familiares, quienes de forma incondicional me han prestado su apoyo en los momentos difíciles.

INDICE

	<u>Página</u>
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	1
1.1 Inervación de la circulación coronaria	7
1.1.1 Inervación adrenérgica	9
1.1.2 Inervación colinérgica	13
1.1.3 Inervación no-adrenérgica no-colinérgica	19
1.2 Regulación colinérgica de la circulación coronaria	26
1.3 Receptores colinérgicos	32
1.3.1 Receptores muscarínicos	32
1.3.2 Receptores nicotínicos	39
1.4 Mecanismos en las respuestas a la acetilcolina	42
1.4.1 Regulación de la contracción del músculo liso	44
1.4.2 Regulación endotelial del músculo liso	58
2. OBJETIVOS	77
3. MATERIAL Y METODOS	80
3.1 Material biológico, reactivos y soluciones	81
3.2 Metodología para los estudios funcionales	87
3.3 Valoración de la actividad colinacetiltransferasa	95
3.4 Metodología para los estudios histoquímicos	96
3.5 Cálculos y análisis estadístico	101

4. RESULTADOS	104
4.1 Características pasivas, miogénicas y activas de las arterias coronarias de resistencia	105
4.2 La respuesta a la acetilcolina	110
4.3 Actividad colinacetiltransferasa y distribución de la actividad acetilcolinesterasa en la circulación coronaria	124
4.4 Respuestas a la estimulación eléctrica transmural	135
4.5 Caracterización del receptor muscarínico contráctil	140
4.6 Caracterización del receptor muscarínico relajante	151
4.7 Caracterización de la respuesta mediada por receptores nicotínicos	157
4.8 Modulación endotelial de la respuesta a la acetilcolina	162
5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	179
5.1 Consideraciones metodológicas y características morfológicas y funcionales de las arterias coronarias del cordero	180
5.2 La respuesta a la acetilcolina en la circulación coronaria	187
5.3 Actividad colinacetiltransferasa (ChAT), acetilcolinesterasa (AChE) y efecto de inhibición de la AChE	192
5.4 Estimulación eléctrica de las arterias coronarias de resistencia	199
5.5 Caracterización del receptor muscarínico contráctil	201
5.6 Caracterización del receptor muscarínico relajante	208

5.7 Caracterización de la respuesta mediada por receptores nicotínicos	211
5.8 Modulación endotelial de la respuesta a la acetilcolina	213
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	220
7. BIBLIOGRAFIA	225

RESUMEN DE ABREVIATURAS

A23187	: Ionóforo de calcio.
ACh	: Acetilcolina.
AChE	: Enzima acetilcolinesterasa.
ADN	: Acido desoxiribonucleico.
ARNm	: Mensajero de ácido ribonucleico.
AFDX 116	: 11-[2[(dietilamino)metil]-1-piperidinil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido[2,3b][1,4]benzodiazepin-6ona.
AMP _c	: Monofosfato de adenosina cíclico.
AMP, ADP, ATP	: Mono-, di- y -trifosfato de adenina.
Ca ²⁺	: Ión calcio.
[Ca ²⁺] _i	: Concentracion de Ca ²⁺ intracelular.
CGRP	: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
ChAT	: Enzima colinacetiltransferasa.
CM	: Calmodulina.
DAG	: diacilglicerol.
4-DAMP	: 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodide.
E _m	: Potencial de membrana.
EDCF	: Factor contráctil derivado del endotelio.
EDRF	: Factor relajante derivado del endotelio.
EDHF	: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
EET	: Estimulación eléctrica transmural.
ET	: Endotelina.

GMP, GDP, GTP	: Mono-, di- y -trifosfato de guanina.
GMP _c	: Monofosfato de guanina cíclico.
HHSiD	: Hexahidrosiladifenidol.
5-HT	: Serotonina, 5-hidroxitriptamina.
IP ₃	: Inositol trifosfato.
LDA	: Arteria coronaria izquierda anterior descendente.
LNNA	: N ^G -L-NO-arginina.
McN-A-343	: 4-hidroxi-2-butiril-1-trimetilamonio.
MLC	: Cadenas ligeras de miosina.
MLCK	: Quinasa de la cadena ligera de miosina.
MLCP	: Fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina.
NA	: Noradrenalina.
NADPH-d	: Diaforasa de fosfato de nicotinamida-adenin- dinucleótido
NANC	: neurotransmisor no-adrenérgico no-colinérgico
NDGA	: Acido norhidroguaiarético
NKA	: Neurokinina A.
NO	: Oxido nítrico.
NPY	: Neuropeptido Y.
PACAP	: Péptido pituitario que activa la adenilato ciclasa.
pFHHSiD	: Paraflurohexahidrosiladifenidol.
PGI ₂	: Prostaciclina.
PHI	: Péptido histidina isoleucina.
PIP ₂	: Fosfoinositol bifosfato.

SP : Sustancia P.
TTX : Tetrodotoxina.
VIP : Polipéptido intestinal vasoactivo.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

La reducción relativa del flujo sanguíneo coronario o isquemia coronaria es la primera causa de mortalidad humana en el mundo occidental, y está además asociada con un alto índice de morbilidad (LEVY y col., 1988).

Las enfermedades que afectan al flujo sanguíneo coronario se caracterizan frecuentemente por la presencia de una estenosis debida a lesiones ateroscleróticas en una, dos o tres de la arterias coronarias grandes o epicárdicas. Cuando la aterosclerosis progresa se ocluye la luz de la arteria epicárdica y la pérdida de presión debida a esta estenosis se incrementa de manera exponencial originando una disminución de la presión de perfusión distal a la estenosis. Cuando la presión de perfusión distal está por debajo (punto crítico) de la autorregulación de la circulación coronaria, el flujo disminuye de forma brusca, y en esta situación el flujo depende exclusivamente de la presión sanguínea. El punto crítico para la presión de perfusión distal se alcanza cuando la estenosis ocluye el 85% de la luz de la arteria coronaria proximal en condición de reposo, mientras que en situación de ejercicio, este punto se alcanza cuando la estenosis ocluye la arteria en un 45%. De este modo, tradicionalmente una estenosis se puede considerar como una estenosis orgánica o fija que impide el incremento del flujo sanguíneo para el miocardio y de esta manera causa isquemia (GOULD y col., 1974; MACALPIN y col., 1980; JOST y col., 1993). Sin embargo, está claro que otros factores importantes intervienen en la patogénesis de la isquemia del miocardio (Figura I). En primer lugar, las propiedades antitrombogénicas de la pared vascular están reducidas a nivel de una estenosis, conduciendo con frecuencia a la formación

Manifestaciones funcionales y estructurales de enfermedades que afectan la circulación coronaria.

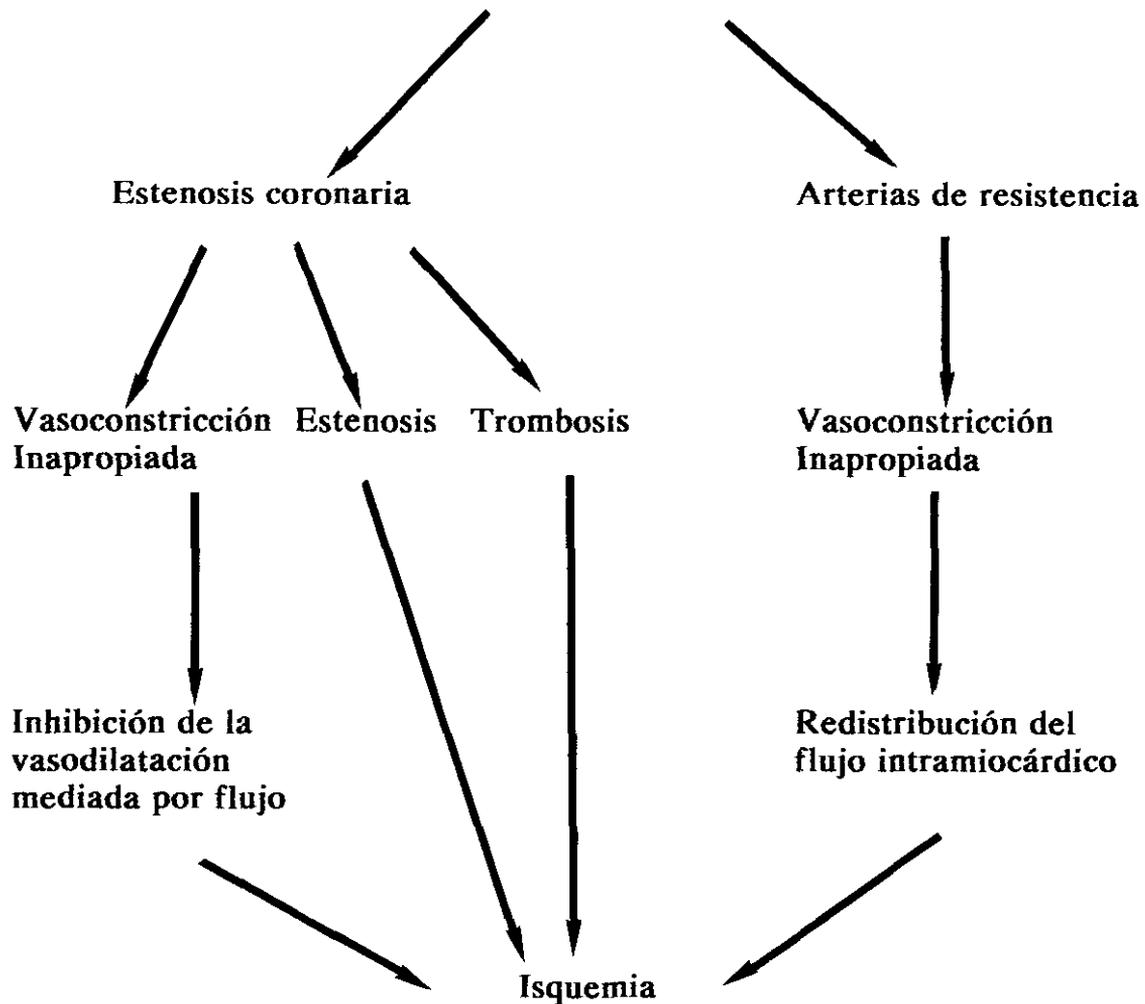


Figura I. Esquema de posibles procesos implicados en la reducción del flujo sanguíneo coronario (isquemia) en enfermedades que afectan a la circulación coronaria. En la mayoría de los casos se trata del desarrollo de una lesión aterosclerótica en una o más de las arterias grandes o epicárdicas que conduce a la formación de una estenosis en la pared de estas arterias, pero la afección funcional también se extiende a las arterias de resistencia.

de un trombo y oclusión del flujo sanguíneo coronario. Un segundo factor que se asocia a una lesión aterosclerótica en las arterias coronarias grandes, es una vasoconstricción inapropiada (BERTRAND y col., 1982) causada por disfunción endotelial o por acumulación en las lesiones ateroscleróticas de lipoproteínas oxidadas, que probablemente potencian los efectos de vasoconstrictores endógenos (GALLE y col., 1990). La disfunción endotelial también está asociada a una inhibición de la vasodilatación mediada por incrementos del flujo sanguíneo coronario en situaciones de ejercicio, que conduce a la isquemia coronaria (NABEL y col., 1990, GORDON y col., 1989).

Además de una interrupción de la autorregulación causada por los factores asociados a una estenosis proximal, se ha sugerido que la isquemia coronaria podría atribuirse a una vasoconstricción inapropiada debida a la disfunción endotelial de los vasos intramiocárdicos o arterias de resistencia. Apoyando esta hipótesis está la observación, mediante la inyección de microesferas, de que se produce un cambio en la relación entre el riego sanguíneo del subepicardio y el subendocardio en situaciones de isquemia. En condiciones normales esta relación es de 1-1.2, mientras que en condición de isquemia es de 0.3.

Junto con la serotonina, noradrenalina e histamina, se ha sugerido que la acetilcolina podría ser un posible candidato que origine una vasoconstricción inapropiada o vasoespasmo en la circulación coronaria. La mayoría de los estudios de función de la circulación coronaria bajo condiciones fisiopatológicas se han hecho con infusión de un agonista y observación mediante angiografía de las

arterias grandes o epicárdicas. En la mayoría de los casos se ha utilizado acetilcolina para investigar una posible alteración de la función endotelial en las arterias grandes. Se ha descrito que en diversas condiciones fisiopatológicas la respuesta a la acetilcolina está modificada de un efecto vasodilatador o ningún efecto, a un efecto vasoconstrictor. La inyección subcutánea del agonista colinérgico, metacolina, causó vasoespasmo en pacientes con Síndrome X o angina variante de Prinz Metal (ENDO y col., 1976) y posteriormente se confirmó esta observación con la infusión de acetilcolina en el mismo grupo de pacientes (HORIO y col., 1986; YASUE y col., 1986). La acetilcolina indujo vasodilatación después de su infusión en la circulación coronaria, que se convirtió en vasoespasmo en pacientes con lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias (LUDMER y col., 1986; ZEIHNER y col., 1991). La acetilcolina infundida produjo vasoconstricción en pacientes con cardiomiopatía dilatada (TREASURE y col., 1990) y la vasodilatación de las arterias grandes probablemente está inhibida en pacientes que sufren hipertensión o diabetes (BRUSH y col., 1992; TREASURE y col., 1992; NITENBERG y col., 1993). En animales experimentales se ha demostrado que muchas de las enfermedades cardiovasculares que afectan a la circulación coronaria lo hacen en forma global (CHILIAN y col., 1990; SELLKE y col., 1990; SIMONSEN y col., 1992; KUO y col., 1992). La infusión de acetilcolina en los estudios con angiografía mencionados anteriormente, fue aplicada como test de la función endotelial bajo condiciones fisiopatológicas. La acetilcolina normalmente está considerada como uno de los neurotransmisores clásicos que median las funciones parasimpáticas del sistema nervioso autónomo periférico. Todavía es un tema controvertido si la acetilcolina tiene un papel

funcional relevante bajo condiciones normales en la circulación coronaria.

Se considera que el flujo sanguíneo coronario está regulado por cuatro factores determinantes (FEIGL, 1983). Primero, la presión de perfusión que corresponde a la presión sanguínea en la aorta. Segundo, la presión del miocardio extravascular que casi detiene el flujo sanguíneo coronario durante la sístole cardíaca. Tercero, el control local metabólico o consumo de oxígeno que a su vez se puede dividir en 4 fracciones: consumo básico o de mantenimiento, consumo dependiente de la frecuencia cardíaca, consumo/metabolismo dependiente de la tensión/presión del ventrículo izquierdo y consumo dependiente del volumen sistólico. El cuarto factor que regula el flujo sanguíneo coronario es el control nervioso. Este último factor ha sido poco explorado y considerado de poca importancia, probablemente porque los otros tres factores enmascaran el efecto de la infusión de agonistas o del estímulo de los nervios autónomos. Además de tener un posible efecto directo sobre el sistema vascular del corazón, el sistema nervioso autónomo regula la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico), el sistema de conducción (efecto dromotrópico) y la contractilidad del músculo cardíaco (efecto inotrópico). Un cambio en uno de estos parámetros, inevitablemente influye en el consumo de oxígeno y por lo tanto causa un cambio indirecto del flujo sanguíneo coronario, ocultando el efecto directo del sistema nervioso autónomo sobre la circulación coronaria (YOUNG y col., 1987). Los estudios *in vitro* evitan la influencia de la presión de perfusión y de los cambios en la presión extravascular y el metabolismo del corazón a la hora de investigar el efecto de un agonista o de la estimulación eléctrica de nervios autónomos, pero por otro lado, el uso exclusivo de técnicas *in*

vitro excluye obtener información sobre la influencia de dichos factores sobre el flujo sanguíneo coronario. La gran mayoría de las investigaciones in vitro de segmentos arteriales aislados se han concentrado en las partes proximales de la circulación coronaria debido a dificultades técnicas para obtener segmentos distales, y existe, por tanto, poca información sobre la regulación de las arterias intramíocárdicas o arterias de resistencia. Sin embargo, la utilización de técnicas microvasculares desarrolladas inicialmente por Bevan y Osher (1972) y modificadas posteriormente por Mulvany y Halpern (1976), ha permitido el estudio de segmentos aislados de estas arterias tanto con métodos para medir la presión intraluminal en un segmento aislado como para medir la fuerza isométrica o isotónica (MULVANY y HALPERN, 1976; MULVANY y NYBORG, 1980; HALPERN, 1991; NILSSON y SJÖBLOM, 1985).

1.1 Inervación de la circulación coronaria

El corazón recibe inervación tanto del vago como de nervios simpáticos, de naturaleza eferente y aferente. Los nervios cardiacos postganglionares simpáticos utilizan noradrenalina como neurotransmisor y además contienen el neuropeptido Y (NPY) (VON EULER, 1946; LUNDBERG y col., 1982). Los nervios cardiacos postganglionares parasimpáticos son colinérgicos, pero algunas células ganglionares parasimpáticas contienen polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina y óxido nítrico (NO) (DELLA y col., 1983; CAMPELL y col., 1982; FRANCO-CERECEDA y col., 1986; TANAKA y col., 1993a, b).

Las fibras nerviosas sensoriales o aferentes son de calibre fino y pueden ser mielínicas (fibras A-delta) o amielínicas (fibras C). Las dos tipos tienen tanto un origen vagal como espinal. Las últimas, o fibras aferentes simpáticas tienen sus cuerpos celulares en los ganglios espinales. Las fibras nerviosas aferentes tienen terminaciones en el corazón de naturaleza polimodal, y consecuentemente responden tanto a estímulos químicos como mecánicos. Las fibras aferentes han sido identificadas a través de estudios electrofisiológicos, pero las fibras del tipo C, tanto las vagales como los espinales, también se pueden identificar mediante métodos inmunocitoquímicos, ya que contienen una variedad de péptidos tales como sustancia P, neurokinina A y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).

La oclusión del flujo sanguíneo coronario y la isquemia del miocardio activan los aferentes simpáticos y parasimpáticos, y parece ser que la respuesta refleja provocada por la obstrucción del flujo sanguíneo coronario depende de la localización de la isquemia. Así, un infarto anterior induce actividad simpática con taquicardia e hipertensión, mientras que un infarto en la pared inferior causa actividad vagal con bradicardia e hipotensión (BISHOP y col., 1983). La estimulación de las fibras aferentes simpáticas del tipo A no tiene efecto sobre el flujo sanguíneo coronario, mientras que la estimulación de las fibras C causa una vasodilatación de la circulación coronaria similar al efecto de la noradrenalina en el gato (BROWN, 1986).

A principios de siglo se sugirió que la circulación coronaria recibía una

inervación dual simpática-parasimpática y que esta circulación tenía la inervación más abundante observada en el cuerpo (WOOLARD, 1926). Esta observación podría ser equívoca, especialmente en el caso de las arterias grandes, dado que las fibras nerviosas que inervan el miocardio y vasos distales siguen un recorrido perivascular (SCHIEBLER y WINCKLER, 1971). Sin embargo, mediante técnicas inmunocitoquímicas aplicando anticuerpos para el producto del gen de la proteína 9.5 (PGP 9.5) que se encuentra en el citoplasma neuronal, estudios recientes han confirmado que la circulación coronaria tiene una inervación densa (GULBENKIAN y col., 1987). Mientras que está generalmente aceptado que existe una inervación adrenérgica, la evidencia de una inervación colinérgica de la circulación coronaria es más controvertida (FEIGL, 1989). Aparte de estos sistemas, se ha demostrado una inervación peptidérgica con fibras que contienen NPY, VIP, CGRP y taquininas (WHARTON y GULBENKIAN, 1989). Por otro lado, existe escasa información sobre una posible inervación serotoninérgica, purinérgica o nitrérgica de la circulación coronaria.

1.1.1 Inervación adrenérgica de la circulación coronaria

La inervación simpática del corazón y los vasos periféricos tiene su origen en las neuronas situadas en las partes laterales de la formación reticularis, en la parte bulbar del tronco encefálico (centro vasomotor). Los axones de estas neuronas forman el tracto bulboespinal y descienden en las columnas anterolaterales. Contienen dos tipos de neuronas, unas excitadoras que liberan noradrenalina y otras que liberan serotonina para inhibir las células preganglionares (SHEPHERD

y VANHOUTTE, 1980). Las fibras simpáticas preganglionares para el corazón tienen origen en el cuarto y quinto segmento torácico de la médula espinal y forman conexiones con las fibras postganglionares en los ganglios cervicales y torácico-cervical (ganglio estellar) y ganglios del plexo cardíaco, utilizando ACh como neurotransmisor. Las fibras simpáticas inervan los nódulos sinoatrial y atrioventricular y sistema de conducción, el miocardio de la aurícula y ventrículo y los vasos sanguíneos.

Mediante la técnica de histofluorescencia descrita por FALCK y col. (1965), que utiliza paraformaldehído para localizar el contenido de aminas biógenas en los tejidos, se ha demostrado la presencia de un complejo nervioso adrenérgico perivascular tanto en arterias grandes como pequeñas de la circulación coronaria (DENN y STONE, 1976; DOLEZEL y col., 1978; HOLMGREN, 1985). La técnica más específica de localización inmunocitoquímica de la enzima tirosina-hidroxilasa ha confirmado la presencia de una inervación adrenérgica de la circulación coronaria en el cobaya (GULBENKIAN y col., 1990).

Por otra parte, estudios de microscopía electrónica han descrito terminaciones varicosas con vesículas densas, de naturaleza adrenérgica, en la unión adventicia-media sin penetración en el músculo liso coronario (DENN y STONE, 1976; DOLEZEL y col., 1978). Las terminaciones varicosas se acercan a las células del músculo liso hasta una distancia de 0.1-0.5 μm . Se ha sugerido que la neurotransmisión en arterias musculares o arterias pequeñas ocurre como resultado de un transmisor liberado de conexiones neuromusculares especializadas, mientras

que en arterias elásticas el neurotransmisor se libera de terminaciones varicosas distantes (LUFF, 1991).

Las arterias coronarias epicárdicas caninas contienen 0.4 μg de noradrenalina por gramo de tejido (RORIE y SHEPHERD, 1980), contenido menor que el observado en las arterias mesentéricas o cerebrales del perro (TODA y col., 1978).

La liberación de noradrenalina de nervios simpáticos tiene una influencia importante en el tono vascular coronario y la perfusión del miocardio. La circulación coronaria está caracterizada por tener una distribución heterogénea de receptores alfa- y beta-adrenérgicos, con dominio de los primeros en las arterias grandes o epicárdicas y de los receptores beta-adrenérgicos en las arterias pequeñas o intramiocárdicas (FEIGL, 1983; TODA y MIYAZAKI, 1987; NYBORG, 1990). El efecto de la noradrenalina en las arterias coronarias grandes es una vasoconstricción directa mediada por receptores α -adrenérgicos (ZUBERBUHLER y BOHR, 1965; FEIGL, 1967; HOLTZ y col., 1977; VATNER y col., 1980; COHEN y col., 1983; YOUNG y VATNER, 1986). En estudios in vivo usando estimulación de los nervios simpáticos o infusión de noradrenalina, se ha observado un incremento de la resistencia vascular coronaria y reducción transitoria del flujo sanguíneo coronario mediada por receptores alfa-adrenérgicos (MCRAVEN y col., 1971; MARK y col., 1972; KELLEY y FEIGL, 1978; VATNER y col., 1980; MORELAND y BOHR, 1984). En presencia de un bloqueo de los receptores alfa-adrenérgicos, se observó una vasodilatación con infusión de noradrenalina. Sin embargo en estudios realizados in vitro, la constricción mediada por receptores

alfa-adrenérgicos es mínima o nula, mientras que se observa relajación a través de receptores beta-adrenérgicos (ZUBERBUHLER y BOHR, 1965; ANDERSON y col., 1973; NAKAYAMA y col., 1988). La falta de vasoconstricción mediada por receptores alfa-adrenérgicos, observada en estudios de segmentos aislados de arterias coronarias pequeñas, en contraste con los estudios hechos in vivo, se puede atribuir a diferentes factores. Así, los factores metabólicos y la influencia autorreguladora podrían complicar los resultados obtenidos en animales vivos a pesar de los intentos de controlar estos efectos. Además, la vasoconstricción podría ocurrir en vasos más grandes que las arterias analizadas in vitro, y parece existir una distribución heterogénea de los receptores alfa-adrenérgicos en la circulación coronaria (CHILIAN y col., 1989). En todos los estudios realizados con arterias coronarias pequeñas, se ha utilizado noradrenalina exógena para investigar las respuestas adrenérgicas y esto causa una estimulación tanto de los receptores inervados como no-inervados, mientras que una estimulación de los nervios simpáticos probablemente solo activa los receptores inervados (HIRST y NIELD, 1980). Finalmente, otros neurotransmisores vasoconstrictores tales como el NPY y el ATP se pueden liberar de los nervios simpáticos (BURNSTOCK, 1986, LUNDBERG y HÖKFELT, 1986).

Los receptores adrenérgicos y endoteliales, que normalmente están considerados como extrajuncionales o no-inervados, podrían ser activados por noradrenalina o adrenalina circulantes. En la circulación coronaria se ha demostrado la presencia de receptores alfa₂-adrenérgicos en el endotelio, que median la liberación del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (COCKS y ANGUS, 1983) y de una

fracción de beta-adrenoceptores que causan relajación a través del endotelio en las arterias grandes (RUBANYI y VANHOUTTE, 1985). Sin embargo, en las arterias coronarias de resistencia se ha sugerido recientemente que una parte de la vasodilatación beta-adrenérgica en perros conscientes se realiza a través de la liberación de EDRF (PARENT y col., 1993), pero los estudios in vitro de arterias coronarias pequeñas no confirman que la liberación de EDRF esté mediada a través de receptores beta-adrenérgicos (QUILLEN y col., 1992).

1.1.2 Inervación colinérgica de la circulación coronaria

La inervación parasimpática del corazón tiene un origen ipsilateral en los núcleos eferentes de la médula oblongada, como se ha descrito usando la técnica de la peroxidasa de rábano y estimulación eléctrica de los núcleos de la médula (LÖFFELHOLZ y PAPANO, 1985). En aves, los somas celulares se encuentran en los núcleos dorsales, pero por ejemplo, en mamíferos como el gato el núcleo ambiguus contiene la mayoría de somas (72%) seguido por los núcleos dorsales motores (19%) y la zona intermedia (9%) (NOKOSA y col., 1979). Las fibras parasimpáticas con origen en estos núcleos del tronco del encéfalo, alcanzan el corazón a través del nervio vago, de sus partes cervicales y torácicas. Estas fibras preganglionares proporcionan una inervación bilateral a los ganglios parasimpáticos intracardiacos. En la rata y en el gato, la parasimpatectomía bilateral de las fibras preganglionares redujo el contenido de ACh, mientras que una vagotomía unilateral fue totalmente ineficaz (BROWN y col., 1980; LUND y col., 1979). Los ganglios cardiacos intrínsecos, a partir de los cuales se originan las fibras vagales

postganglionares para el corazón, están situados en el subendocardio del septo auricular, en la parte posterior de la aurícula, en el tejido conectivo subepicárdico, y en el sulcus atrioventricular (RICKENBACHER y MÜLLER, 1979). Las fibras postganglionares parasimpáticas colinérgicas se distribuyen en el nódulo sinoatrial, el nódulo atrioventricular, el sistema de conducción, las aurículas y los ventrículos. Las escasas fibras parasimpáticas que inervan el ventrículo y probablemente los vasos ventriculares, proceden de ganglios atrioventriculares de la superficie subendocardial (MARTINS y ZIPES, 1980; BARBER y col., 1984). La aplicación de fenol a la pared anterior libre del ventrículo izquierdo interrumpió los nervios eferentes simpáticos, pero no las fibras vagales eferentes para el epicardio y endocardio, mientras que un infarto de miocardio transmural inhibió tanto la transmisión eferente simpática como la parasimpática para la zona del miocardio sin infarto, y situada apicalmente al infarto. Eso se debe probablemente a una destrucción de los nervios eferentes que atraviesan la zona de infarto (BARBER y col., 1984). Estos autores demostraron también que ocurría lo mismo en el caso de las fibras aferentes activadas por nicotina y que discurren en el nervio vago (BARBER y col., 1984).

La síntesis de ACh se realiza a través de la acetilación de la colina, a partir del acetyl coenzima A (acetyl CoA), en una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) (Figura II) que tiene lugar en el citoplasma de la terminación nerviosa (WHITTAKER y col., 1986):



La regulación de la síntesis de ACh depende de la captación específica de colina a través de un transporte de alta afinidad saturable ($1-5 \mu\text{M}$) y un transporte de baja afinidad ($40-50 \mu\text{M}$) para colina. La actividad ChAT no parece representar un paso regulador en la formación de ACh ya que la actividad máxima (V_{max}) de la ChAT es muy superior a la velocidad de producción de ACh (TUCEK, 1984).

La determinación bioquímica de la actividad ChAT con el método de FORNUM (1975) se ha usado como índice de la inervación parasimpática tanto en el corazón como en la circulación cerebral (LUND y col., 1979; ESTRADA y col., 1988). En el corazón, la actividad neuronal ChAT puede derivar de dos fuentes: (1) Las fibras preganglionares parasimpáticas y (2) la inervación postganglionar parasimpática que incluye aquellos nervios que se originan y terminan en el propio corazón, puesto que no existe evidencia de que las células miocárdicas tengan actividad ChAT (ROSKOSI y col., 1977).

En el corazón de rata, la vagotomía a nivel cervical únicamente produjo reducciones de la actividad ChAT en las regiones del nódulo sinusal y atrioventricular, mientras que la actividad de este enzima no estuvo alterada en las aurículas, el septo interventricular o ventrículos, 9 días después de una vagotomía bilateral a nivel cervical (LUND y col., 1979). El método bioquímico para la determinación del ChAT no ha sido aplicado a la circulación coronaria aislada, y por lo tanto, no se sabe si existe actividad ChAT en esta circulación.

En el sistema nervioso central y la circulación cerebral se ha desarrollado un

método inmunocitoquímico para la demostración del ChAT que ha permitido una localización más específica de los nervios colinérgicos (SAITO y col., 1985; MIAO y LEE, 1991), pero este método no se ha aplicado con éxito en la localización de fibras colinérgicas en el sistema autónomo periférico, probablemente debido a la existencia de diferentes isoenzimas del ChAT. Otra aproximación para la localización de nervios colinérgicos ha sido el desarrollo de un método histoquímico del ChAT en el sistema nervioso central (KASA y col. 1970), pero la especificidad de este método no fue suficientemente alta para garantizar que todos los precipitados correspondieran a fibras colinérgicas (BURT, 1970).

El endotelio podría ser otra fuente de formación de ACh, como indican observaciones ultraestructurales de ChAT en células endoteliales de arterias cerebrales (PARNAVELAS y col., 1985; KAWASHIMA y col., 1990) y en arterias coronarias de rata (MILLNER y col., 1988), y el hecho de que se encuentra AChE en el corazón de aves en un estado embrionario antes de que llegue la inervación parasimpática al órgano (JO y col., 1992).

Las indicaciones de una inervación colinérgica de la circulación coronaria proceden mayoritariamente de la determinación histoquímica con microscopía óptica de la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE metaboliza la ACh para dar colina y acetato, los cuales pueden ser recaptados por la neurona y reutilizados en la síntesis de ACh (Figura II).



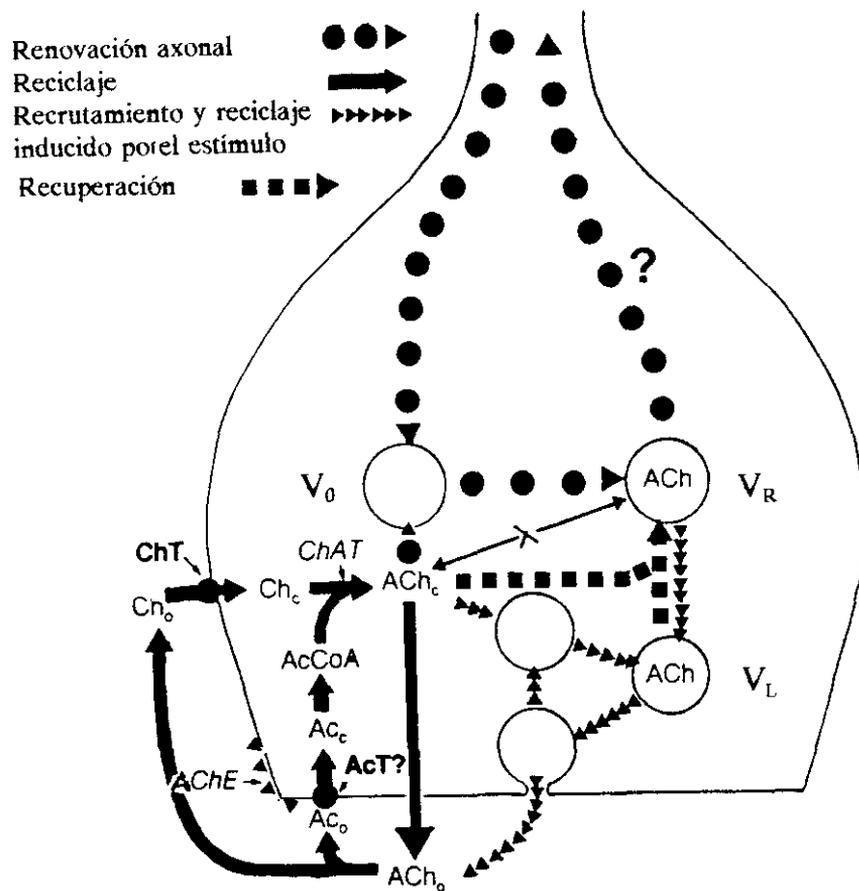


Figura II. Representación de los procesos implicados en la neurosecreción colinérgica (modificado de WHITTAKER, 1986). Vesícula sináptica sintetizada en el cuerpo neuronal (V_0), vesículas de reserva (V_R) y vesículas de liberación (V_L). ACS, acetil-CoA sintetasa; ChAT, colina acetiltransferasa; AChE, acetilcolinesterasa; AcT, transportador para el acetato; ChT, transportador de alta afinidad para la colina.

La AChE se encuentra en concentraciones muy altas en fibras nerviosas colinérgicas. No obstante estos resultados se deben interpretar con precaución puesto que la enzima también se ha encontrado en fibras nerviosas adrenérgicas, dopaminérgicas y peptidérgicas (KOELLE y col., 1955; BARAJAS y WANG, 1975).

La evidencia de una inervación colinérgica de la circulación coronaria procede de la demostración de fibras AChE positivas en las arterias coronarias grandes de la rata (BURNSTOCK, 1980), gato (SCHENK y BADAWI, 1968), perro (SCHENK y BADAWI, 1968; DENN y STONE, 1976; GEROVA y col., 1979), primates no-humanos (PILLAY y REID, 1982) y del hombre (AMENTA y col., 1981). La presencia de una inervación colinérgica de las arterias grandes y pequeñas de primates fue demostrada mediante la determinación de la AChE en monos, después de la destrucción de los nervios simpáticos con guanetidina (PILLAY y REID, 1982). Sin embargo, estos estudios no confirman definitivamente la presencia de una inervación colinérgica, puesto que la AChE puede estar presente en fibras sensoriales descritas en la circulación coronaria (GULBENKIAN y col., 1993), y en contraste, otros autores no han encontrado fibras AChE positivas en las arterias coronarias pequeñas, sino únicamente en las arterias de gran calibre (AMENTA y col., 1981). DENN y STONE (1976) desarrollaron varios procedimientos para determinar la fuente de las fibras AChE positivas encontradas en las arterias grandes de la circulación coronaria del perro. La sección del nervio vago a nivel cervical, no indujo una pérdida de la actividad AChE en las arterias coronarias, y estos autores sugirieron que las fibras colinérgicas probablemente tienen su origen en células ganglionares situadas en la base del corazón

(JACOBOVITZ, 1967; NAVARATNAM y PALKAMA, 1965; NAVARATNAM y col., 1968; DENN y STONE, 1976), y siguen un recorrido similar al de las fibras que inervan el miocardio del ventrículo (BARBER y col., 1984).

En estudios ultraestructurales realizados con microscopía electrónica, donde los nervios colinérgicos han sido identificados como varicosidades nerviosas con vesículas claras, dichas vesículas han sido observadas a una distancia de 500 nm de las células musculares lisas y distribuidas en la adventicia de las arterias coronarias de conducción (KRISTEK y GEROVA, 1987), pero se ha sugerido que las arterias y arteriolas aparentemente tienen más terminaciones nerviosas que las arterias más grandes en la circulación arterial de las aurículas (LEVER y col., 1965; MALDOR y col., 1978). En secciones de aurícula de cobaya se han observado fibras nerviosas con vesículas claras lo que sugiere que los capilares cardíacos tienen inervación colinérgica (MALDOR y col., 1978).

1.1.3 Inervación no-adrenérgica no-colinérgica de la circulación coronaria

Además de la inervación clásica adrenérgica y colinérgica, el corazón recibe una rica inervación peptidérgica (GULBENKIAN y col., 1993), mientras que la existencia de una inervación purinérgica, serotoninérgica o nitrérgica es más controvertida. Estos neurotransmisores no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) localizados en fibras nerviosas pueden tener las siguientes funciones fisiológicas: (1) Actuar como hormonas, (2) Actuar como neurotransmisores sobre sus propios receptores, (3) Actuar como neuromoduladores con influencia sobre la liberación

y/o acción de otros transmisores y (4) Actuar con efectos tróficos a largo plazo. En general, estos neurotransmisores (NANC) se pueden dividir en dos grupos: (1) Neurotransmisores o moduladores de los nervios autónomos simpáticos (NPY, ATP, encefalinas), parasimpáticos (VIP, somatostatina, NO, galanina) o independientes (serotonina, VIP, neurotensina) y (2) neurotransmisores liberados de fibras sensoriales aferentes por acción antidrómica (CGRP, SP y neuroquinina A).

En diversas circulaciones se ha demostrado que el ATP es co-liberado con la noradrenalina de nervios simpáticos (BURNSTOCK, 1988; BAO y col. 1993). El ATP exógeno infundido en el corazón aislado de rata puede inducir constricción a través de receptores P_{2X} en el músculo liso o vasodilatación a través de receptores P_{2Y} en el endotelio o músculo liso (HOPWOOD y BURNSTOCK, 1987). Los receptores endoteliales probablemente no se activan con el ATP liberado de los nervios, sino que podrían mediar los efectos del ATP liberado de plaquetas o del propio endotelio. En lo que respecta a la circulación coronaria, se ha observado en segmentos aislados de arterias coronarias de conejo y cobaya un efecto vasodilatador del ATP mediado a través de receptores P_{2Y} localizados tanto en el endotelio como el músculo liso vascular, pero los purinoceptores P_1 solo han sido localizados en el músculo liso (KEEF y col., 1992). Un efecto vasorelajante similar mediado a través de receptores beta-adrenérgicos, se ha obtenido con noradrenalina en la misma preparación y los autores han sugerido que el ATP y la noradrenalina podrían ser co-transmisores (CORR y BURNSTOCK, 1991). Sin embargo, queda por demostrar una co-liberación de ATP y noradrenalina en la

circulación coronaria. Además, existe evidencia de que el ATP puede ser liberado de forma antidrómica a partir de fibras sensoriales (BURNSTOCK y col., 1987).

El NPY se ha encontrado en nervios cardiacos de tejido humano, en concentraciones especialmente altas alrededor de los vasos coronarios (GU y col., 1983; CORR y col., 1990; GULBENKIAN y col., 1993); el doble marcaje inmunocitoquímico para este péptido y la enzima tirosina-hidroxilasa ha demostrado la coexistencia del NPY y la noradrenalina en nervios adrenérgicos de la circulación coronaria (CORR y col., 1990; GULBENKIAN y col., 1993). Así mismo, la retirada quirúrgica del ganglio estrellado o destrucción de los nervios simpáticos con guanetidina origina una pérdida casi completa de las fibras inmunoreactivas para la tirosinohidroxilasa y el NPY en el corazón de cobaya (DALSGAARD y col., 1986; CORR y col., 1990). Por último, la estimulación de los nervios cardiacos simpáticos para el corazón aislado de cobaya o cerdo sugiere que la noradrenalina y el NPY también se liberan juntos (RUDEHILL y col. 1986). La infusión intracoronaria del NPY produce vasoconstricción de la circulación coronaria (FRANCO-CERECEDA y col., 1985a). El NPY tiene un efecto directo como vasoconstrictor a través de receptores en el músculo liso que predomina en las arterias coronarias pequeñas y un efecto indirecto incrementando la vasoconstricción alfa-adrenérgica e inhibiendo la vasodilatación beta-adrenérgica, efecto que es más marcado en las arterias coronarias proximales o de conducción (FRANCO-CERECEDA y col., 1985a; HAN y ABEL, 1987; PRIETO y col., 1991a; GULBENKIAN y col., 1992).

No se ha encontrado inmunoreactividad para el NPY en fibras AChE positivas en la circulación coronaria (GULBENKIAN y col., 1993) y su posible efecto de modulación de las respuestas colinérgica está poco estudiado, pero se ha demostrado que inhibe la relajación dependiente del endotelio causada por la ACh (HAN y ABEL, 1987; GULBENKIAN y col., 1993).

En el corazón de cobaya se ha localizado inmunoreactividad para encefalina asociada a los nervios simpáticos y el tratamiento con 6-hidroxidopamina reduce la cantidad de encefalina (LANG y col., 1983).

El péptido VIP de 28 amino ácidos es homólogo al PHI-27 (péptido con histidina en el terminal N e isoleucina en el terminal C) y derivado de la misma promolécula que la forma humana, PHM (metionina en el terminal C). El VIP también comparte propiedades de homología y función con el péptido pituitario que activa la adenilato ciclasa (PACAP) (HUANG y col., 1993). La inmunoreactividad para el VIP es mucho más escasa que la inmunoreactividad para el NPY hallada en fibras nerviosas tanto en las partes proximales como distales de la circulación coronaria (GULBENKIAN y col., 1993). La inmunoreactividad para el VIP se ha localizado en el corazón humano, de mono, cobaya y rata, donde aparte de estar localizado en fibras nerviosas para los vasos coronarios se ha encontrado en fibras nerviosas para la aurícula y el sistema de conducción (WEIHE y col., 1984; BRUM y col., 1986). El VIP ejerce un efecto directo cronotrópico e inotrópico positivo (DE NEEF y col., 1984; UNVERFERTH y col. 1985; FRANCO-CERECEDA y col., 1987a) y se ha demostrado que es un

vasodilatador potente en la circulación coronaria in vivo e in vitro a través de una activación de la adenilato ciclasa independiente del endotelio (BRUM y col., 1986; FORSMANN y col., 1988; ITOH y col., 1990). El PHI y PHM son menos potentes como vasodilatadores, mientras que el PACAP tiene igual potencia que el VIP en la circulación coronaria (ITOH y col. 1990; HUANG y col., 1993).

En la rana se ha localizado inmunoreactividad para la somatostatina en nervios parasimpáticos y probablemente este neuropéptido se almacena con la ACh en nervios parasimpáticos postganglionares, se liberan juntos con la estimulación vagal y tienen un efecto inotrópico negativo tanto en la rana como en el corazón humano (CAMPELL y col., 1982; DIEZ y col., 1985; FRANCO-CERECEDA y col., 1986, 1987). La somatostatina tiene un efecto relajante similar al efecto del VIP en arterias coronarias humanas (FRANCO-CERECEDA y RUDEHILL, 1989).

Se ha localizado inmunoreactividad para la galanina en el corazón de cobaya pero su función no se conoce. En el sistema nervioso central la galanina coexiste con la ACh y su principal efecto es la inhibición presináptica de los nervios colinérgicos a altas frecuencias de estimulación eléctrica (HÖKFELT y col., 1989).

Recientemente, se ha sugerido que el NO podría ser un neurotransmisor no-adrenérgico, no-colinérgico. Es posible localizar las células que sintetizan NO mediante la tinción histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPH-d) o mediante la localización inmunocitoquímica de la sintasa del óxido nítrico. De este modo, se han localizado además de en las células endoteliales y endocárdicas, neuronas

positivas para la NADPH-d y sintasa del NO en ganglios intracardiacos del septo atrial del corazón de cobaya (TANAKA y col. 1993a, 1993b). Sin embargo, algunos de estos procesos neuronales podrían tener un origen extrínseco representando fibras parasimpáticas preganglionares, fibras simpáticas postganglionares o nervios sensoriales aferentes. Sin embargo, la actividad NADPH-d en neuronas del núcleo ambiguus, núcleo motor dorsal del vago, ganglio cervical superior y ganglio celiaco es muy escasa o nula (GONZALEZ y col. 1987; GROZDANOVIZ, 1992; VINCENT y KIMURA, 1992), pero algunas subpoblaciones de neuronas sensoriales en el ganglio nodoso o dorsal contienen una alta actividad NADPH-d (AIMI y col. 1991; MORRIS y col., 1992). El NO podría actuar como neurotransmisor y contribuir a los efectos ya descritos sobre el corazón y vasculatura del NO liberado del endocardio o células endoteliales (mirar sección 1.4.2).

El CGRP es un péptido de 37 aminoácidos y existe en dos formas estructurales, alfa-CGRP y beta-CGRP, que se han localizado en la rata y en tejido humano (AMARA y col., 1985; FISHER y BRON, 1987). Se ha encontrado abundante inmunoreactividad para el CGRP en el endocardio, pericardio y arterias coronarias, con menor densidad en el miocardio y epicardio (MULDERRY y col., 1985; WHARTON y col., 1986; GULBENKIAN y col., 1993). La inmunoreactividad para el CGRP coexiste con inmunoreactividad para sustancia P (SP) y taquininas tales como neuroquinina A (NKA), en un 90% de las neuronas con inmunoreactividad para el CGRP (GIBBINS y col., 1985). Estos péptidos son sensoriales y están localizados en fibras cardiacas no-mielínicas y aferentes del tipo C. La activación de las fibras C utilizando capsaicina, nicotina, bradiquinina, ouabaina o induciendo

isquemia causa la liberación de inmunoreactividad para el CGRP, SP y NKA (HOOVER, 1987; FRANCO-CERECEDA y col., 1988, 1989), y el tratamiento sistémico con capsaicina conduce a la pérdida tanto de inmunoreactividad para el CGRP como para la SP en el corazón (MULDERRY y col., 1985; URBAN y PAPKA, 1985). Mediante experimentos farmacológicos se ha sugerido que el CGRP y no los taquininas está involucrado en el efecto cronotrópico positivo y vasodilatación coronaria inducidos por la capsaicina (FRANCO-CERECEDA y LUNDBERG, 1985; FRANCO-CERECEDA y col., 1987b; MANZINI y col. 1989). El CGRP tiene un efecto cronotrópico e inotrópico positivo (FRANCO-CERECEDA y LUNDBERG, 1985) y una acción vasodilatadora potente in vivo e in vitro en la circulación coronaria de diversas especies animales (HOLMAN y col., 1986; FRANCO-CERECEDA y col., 1987b; GREENBERG y col., 1987; SHOJI y col., 1987; BÉNY y col., 1989) y del hombre (MCEWAN y col., 1986; THOM y col., 1987; FRANCO-CERECEDA y RUDEHILL, 1989; FRANCO-CERECEDA, 1991). El CGRP causa una vasodilatación dependiente del endotelio en las arterias coronarias proximales mientras que en las arterias intramiocárdicas relaja a través de receptores localizados en el músculo liso vascular de la rata (PRIETO y col., 1991b), aunque en arterias coronarias proximales porcinas, el péptido solo actúa a través de un receptor en el músculo liso activando la enzima adenilato ciclasa (KAGEYAMA y col., 1993). La sustancia P relaja las arterias coronarias a través de la liberación de un factor hiperpolarizante del endotelio (BÉNY y col., 1989), mientras que el efecto vasodilatador de la neurokinina A en la circulación coronaria es menos potente (EZRA y col., 1986; FRANCO-CERECEDA y RUDEHILL, 1989).

También se han encontrado en vasos coronarios otros posibles neurotransmisores como la serotonina, neurotensina y dinorfina entre otros, aunque los efectos de los últimos sobre la circulación coronaria no han sido clarificados y precisan mayor investigación (Burnstock, 1990).

1.2 Regulación colinérgica de la circulación coronaria

El papel del sistema nervioso parasimpático en la regulación de la circulación coronaria es todavía controvertido, a pesar de las extensas investigaciones llevadas a cabo en este campo. Este hecho puede ser atribuido a lo siguiente:

- (1) Los cambios en la presión de perfusión de la circulación coronaria y cambios en el metabolismo que tienen lugar con la estimulación parasimpática.
- (2) Las diferencias potenciales entre el control neural frente al control humoral parasimpático de la circulación coronaria.
- (3) Las diferencias potenciales entre la regulación de arterias grandes frente a arterias coronarias pequeñas.
- (4) Las diferencias entre especies. La mayoría de estudios in vivo se han realizado en el perro, donde el efecto de la estimulación parasimpática y estimulación exógena con agonistas causa vasodilatación de la circulación coronaria (FEIGL, 1969; VAN WINCKLE y FEIGL, 1989). Debido a las diferencias entre especies en lo referente al control colinérgico, este aspecto de la regulación coronaria no se ha clarificado lo suficiente para entender la regulación colinérgica de la circulación coronaria humana.

La estimulación neural o humoral del sistema nervioso parasimpático origina una reducción de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico negativo), disminución de la conducción del impulso (efecto dromotrópico negativo), reducción de la contractilidad del ventrículo izquierdo (efecto inotrópico negativo) y de la presión arterial sistémica. Estos efectos disminuyen el trabajo del corazón y conducen a una reducción del metabolismo miocárdico, seguida de una reducción del consumo de oxígeno y de la presión de perfusión. De este modo, estos efectos pueden enmascarar una acción directa vasodilatadora, vasoconstrictora o ningún efecto de la estimulación parasimpática sobre la circulación coronaria (YOUNG y col., 1987). Después de controlar los factores metabólicos que podrían influir en el flujo sanguíneo coronario (frecuencia cardíaca, presión ventricular), se ha demostrado una vasodilatación colinérgica inhibida por atropina en la circulación coronaria canina, tras la infusión de ACh o tras la estimulación de los nervios vagales (FEIGL, 1969, 1975), del reflejo de Bezold-Jarish (ITO y col., 1985) y de los quimioceptores (HACKETT y col., 1972; ITO y col., 1985). No obstante, este tipo de estudios no se han llevado a cabo en especies donde la respuesta predominante de la ACh infundida sea vasoconstricción. Además, se ha sugerido anteriormente que la circulación coronaria canina reacciona a la ACh solamente con vasodilatación, aunque PELC y col. (1986, 1988) describieron tanto una vasodilatación como una vasoconstricción mediadas por receptor para la ACh infundida. En lo referente a las diferencias entre especies, la estimulación eléctrica del vago en una preparación de Langendorff produjo vasoconstricción de la circulación coronaria de la rata (VAN CHARLDORP y col., 1987; BOGNAR y col., 1990), la estimulación eléctrica periarterial en el corazón de ternera

perfundido también causó vasoconstricción (KALSNER y col., 1979), e igualmente, se ha descrito en el miocardio humano una vasoconstricción inducida con estimulación eléctrica sensible a la atropina (KALSNER, 1989).

Aparentemente, existen también diferencias entre el control neural frente al control humoral parasimpático en la circulación coronaria. Así, la infusión intracoronaria de ACh causa un mayor incremento del flujo sanguíneo coronario en el subendocardio comparado con el subepicardio (GROSS y col., 1979; REID y col., 1985; PELC y col. 1986, 1988), mientras que la estimulación eléctrica del vago induce una vasodilatación uniforme a través de la pared ventricular izquierda en el perro (REID y col., 1985).

Los estudios *in vitro* excluyen la influencia de factores metabólicos en las preparaciones coronarias y permiten comparar la reactividad de segmentos aislados proximales (vasos de distribución) y distales (vasos de entrega), por separado con el fin de revelar diferencias fisiológicas potenciales entre arterias coronarias grandes y pequeñas. La observación inicial de que la estimulación adrenergica causa contracción en las arterias grandes o epicárdicas y relajación en las arterias pequeñas o intramiocárdicas del corazón de ternera (ZUBERBUHLER y BOHR, 1965), fue posteriormente confirmada en estudios *in vitro* comparando la reactividad de arterias coronarias grandes y pequeñas de rata (NYBORG, 1990). Un efecto farmacodinámico heterogéneo también se ha demostrado con la estimulación serotoninérgica y peptidérgica comparando segmentos proximales y distales de la circulación coronaria de la rata y el conejo (NYBORG y col., 1991;

PRIETO y col., 1991a, 1991b; SIMONSEN y col., 1992). En este mismo tipo de estudios, se ha observado que mientras la magnitud de la respuesta relajante a la ACh es similar en arterias coronarias proximales y distales, las primeras fueron más sensibles al agonista colinérgico; en contraste, en la circulación coronaria del conejo, se observó una menor relajación para la ACh en arterias pequeñas precontraídas con potasio comparadas con arterias grandes o epicárdicas (SIMONSEN y col., 1992). Estas diferencias podrían atribuirse a la presencia de una población mayor de receptores contráctiles en las arterias pequeñas, o a una inhibición del factor hiperpolarizante derivado del endotelio en arterias precontraídas con potasio. Por tanto, parece necesario clarificar las diferencias potenciales en la respuesta para la ACh en las arterias grandes y pequeñas de la circulación coronaria, no solo en lo referente a las relajaciones a la ACh dependientes del endotelio, sino también en lo que respecta a las respuestas contráctiles.

A pesar de las grandes diferencias encontradas entre especies, se cree que la innervación colinérgica tiene un papel importante en la distribución del flujo sanguíneo miocárdico (KALSNER y col., 1985). La infusión de ACh en la circulación coronaria en animales vivos reveló que la ACh podría tener un efecto dual, causando vasodilatación a concentraciones bajas y vasoconstricción a concentraciones altas en la circulación del babuino (VAN WINCKLE y FEIGL, 1989; KNIGHT y col., 1991), la ternera y el hombre (KNIGHT y col., 1991; HODGSON y MARSHALL, 1989), vasodilatación en el perro (VAN WINCKLE y FEIGL, 1989; KNIGHT y col., 1991), y solo vasoconstricción en la circulación

coronaria porcina (KAWAMURA y col., 1989; COWAN y MCKENZIE, 1990). En segmentos de arterias grandes o proximales aislados de pacientes, la ACh no produjo relajación de arterias precontraídas y aparentemente contrajo arterias coronarias normales a pesar de que otros agentes como la histamina, sustancia P o bradiquinina causaron relajaciones dependientes del endotelio (FÖRSTERMANN y col., 1986; TODA y OKAMURA, 1989). En base a estas investigaciones, se ha postulado una respuesta normal para la ACh tanto relajante (LÜSHER, 1990) como vasoconstrictora (KALSNER, 1989).

En arterias coronarias humanas de resistencia existen actualmente dos estudios publicados. En la primera investigación de arterias coronarias humanas llevada a cabo por ANGUS y colaboradores (1991a) examinando arterias aisladas de la aurícula, obtenidas de operaciones de bypass, se observó que el efecto de la ACh en arterias de 6 pacientes era vasoconstricción, cuando era añadida sobre una preconstricción inducida con potasio. Todas las arterias tenían el endotelio intacto, como indicó la relajación para la sustancia P (ANGUS y col., 1991a). En el otro estudio, se encontró un efecto relajante para la ACh en arterias humanas aisladas del ventrículo izquierdo de corazones explantados (COOPER y HEAGERTHY, 1992). En resumen, la ACh causa constricción en arterias de algunos pacientes y relajación en arterias de otros, pudiendo atribuirse estas diferencias probablemente a factores como el estado patológico, la edad de los pacientes y el tipo de anestesia utilizado cuando las arterias fueron extraídas. Este tema está abierto a una mayor investigación, pero el problema principal hasta el momento ha sido definir un grupo de pacientes "normales" en los estudios hasta ahora publicados (ANGUS y

col., 1991a; COOPER y HEAGERTHY, 1992).

En los estudios con modelos animales experimentales es más fácil controlar que el animal se encuentre en un estado fisiológico o normal. No obstante, la investigación de la respuesta para la ACh tanto a nivel de arterias grandes como pequeñas de la circulación coronaria de diferentes especies tiende a incrementar la controversia. La ACh induce contracción en arterias grandes aisladas del cerdo, cordero y ternera (BRINEN y col., 1979; KALSNER, 1985; DUCKLES y col., 1988; TSCHUDI y col., 1991), mientras que relaja las arterias coronarias del perro, rata, mono y conejo (COCKS y ANGUS, 1984; OKAMURA y col., 1989; SIMONSEN y col., 1992; PRIETO y col., 1991b). Lo mismo ocurre en el caso de las arterias de resistencia o intramiocárdicas, donde se ha observado relajación en arterias de rata, conejo y perro (MYERS y col., 1989; PRIETO y col., 1991b; SIMONSEN y col., 1992) mientras se ha descrito que las respuestas para la ACh son contráctiles en las arterias coronarias de resistencia porcinas (NAKAYAMA y col., 1988; TSHUDI y col., 1991; ANGUS y col., 1991b). En las arterias porcinas no se encontró ningún efecto relajante para la ACh añadida sobre una preconstricción (NAKAYAMA y col., 1988; TSCHUDI y col., 1991), a pesar de que la inhibición de la sintasa del óxido nítrico produjo un cambio en la sensibilidad de las curvas concentración-respuesta para la ACh (TSCHUDI y col., 1991). Este último efecto se atribuyó a una inhibición de la liberación basal o espontánea de NO. Sin embargo, no se puede excluir que este último efecto esté mediado a través de receptores colinérgicos endoteliales.

1.3 Receptores colinérgicos

Los efectos de la ACh fueron clasificados como muscarínicos y nicotínicos por DALE en 1914. Los efectos de la muscarina eran similares a la estimulación de los nervios parasimpáticos en la pupila, la glándula salivar, el corazón, los bronquios, el estómago y la vejiga urinaria. No obstante, DALE observó que la muscarina estimulaba las glándulas sudoríparas a pesar de que su inervación es simpática y que producía dilatación de todos los vasos incluyendo aquellos sin inervación parasimpática y donde la inervación era puramente constrictora. Desde las observaciones iniciales realizadas por DALE, una gran cantidad de receptores muscarínicos y nicotínicos han sido identificados gracias al desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos y se ha asumido que la ACh media sus efectos a través de receptores clasificados en subtipos muscarínicos y nicotínicos. Los receptores colinérgicos pueden localizarse presinápticamente en los nervios colinérgicos (autorreceptores), en nervios de otra naturaleza (heteroreceptores), o postsinápticamente pudiendo estos últimos localizarse en el endotelio o en el músculo liso de los vasos sanguíneos.

1.3.1 Receptores muscarínicos

La primera evidencia de heterogeneidad de los receptores muscarínicos fue obtenida en 1951 por RIKER y WESCOE quienes observaron que el bloqueante neuromuscular, gallamina, en el gato causaba reversión de los efectos inotrópicos negativos de la metacolina en concentraciones que no alteran la acción hipotensiva

de este agonista. Evidencia adicional de la existencia de diferentes subtipos de receptores muscarínicos vino de la observación que el agonista muscarínico, McN-A-343, tiene la propiedad de estimular selectivamente receptores muscarínicos de ganglios simpáticos mientras que tiene escaso efecto sobre receptores muscarínicos en el corazón y en el yeyuno (ROSZKOWSKI, 1961), y a diferencias de la ACh, este agonista solamente causa hiperpolarización en neuronas del caracol mientras que la ACh induce tanto hiperpolarización como despolarización. En base a estas observaciones, se sugirió inicialmente que los receptores estimulados por el McN-A-343 podrían clasificarse como M_1 , y como M_2 aquellos receptores no afectados por el McN-A-343 (WOODRUFF y WALKER, 1971).

El hecho de que los receptores muscarínicos en el aurícula y en el ileo podrían ser diferentes como indicaban las investigaciones con gallamina (RIKER y WESCOE, 1951) fue reforzado por la observación de que el antagonista muscarínico 4-DAMP (4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide) fue 11 veces más selectivo para los receptores del ileo comparado con los receptores muscarínicos de la aurícula (BARLOW y col., 1976). La existencia de dos subtipos de receptores fue confirmada cuando se demostró que la pirencepina, que tiene una acción selectiva inhibitoria de la secreción gástrica, exhibía una unión heterogénea a nivel de la corteza cerebral, ligándose a diferentes tejidos con distinta afinidad (HAMMER y col., 1980) y antagonizaba la acción hipertensiva del estimulante ganglionar, McN-A-343, en animales vivos, mientras que la potencia sobre los receptores que median la bradicardia vagal era baja (HAMMER y GIACHETTI, 1982). Los receptores M_1 fueron definidos como receptores con alta

afinidad para la pirencepina, estimulados selectivamente por el McN-A-343 y situados en el tejido neuronal y glándulas secretoras, mientras que los receptores M_2 fueron caracterizados como receptores con baja afinidad para la pirencepina y localizados tanto en tejido neuronal como efector (WATSON y col., 1985). Sin embargo, el desarrollo de los antagonistas muscarínicos, AFDX 116, con preferencia por los receptores cardiacos comparados con los del músculo liso (GIACHETTI y col., 1986; DUCKLES y col., 1987) y el HHSiD con más afinidad por los receptores del ileo comparados con los del corazón de rata (FUDER y col., 1985), pronto condujo a la clasificación de los receptores muscarínicos en tres subtipos identificables farmacológicamente M_1 , M_2 , M_3 en base a una afinidad diferente de los antagonistas muscarínicos por dichos receptores. De este modo, la pirencepina y la telencepina tienen alta afinidad por el subtipo M_1 , el AFDX 116, la gallamina y la methoctramina por el M_2 , el 4-DAMP y el HHSiD tanto por los subtipos M_1 como M_3 , y el pFHHSiD por el subtipo M_3 (LAMBRECHT y col., 1988; HULME y col., 1990). Se ha sugerido recientemente la clasificación farmacológica de un cuarto subtipo de receptores muscarínicos con alta afinidad para la himbacina y tropicamida y afinidad intermedia para la pirencepina (LAZARENO y col., 1990; GARCIA-VILLALON y col., 1991; HERNANDEZ y col., 1993). Sin embargo, hay que tener en cuenta que ninguno de los antagonistas muscarínicos descritos es altamente selectivo para un determinado subtipo de receptor por encima de dos órdenes de magnitud, por lo que el estudio funcional para caracterizar un determinado subtipo en un tejido debe basarse en el espectro de afinidades que presentan una serie de antagonistas muscarínicos, incluyendo por lo menos un antagonista con preferencia por cada subtipo de receptor.

Estudios de clonación del genoma (ADN) han identificado 5 productos distintos de genes relacionados con los receptores muscarínicos, denominados m_1 - m_5 (BONNER y col., 1987; PERALTA y col., 1988; BUCKLEY y col., 1989) donde los m_1 , m_2 , m_3 y m_4 son equivalentes a los subtipos farmacológicamente caracterizados M_1 , M_2 , M_3 y M_4 mientras que no se ha encontrado equivalente para el último subtipo genético (BONNER y col., 1989).

El ARNm de los m_1 y m_3 se encuentra en el cerebro y glándulas exocrinas mientras que el ARNm de los m_2 y m_3 abunda en el músculo liso vascular y cardiaco. El transcripto del m_4 tiene una distribución menos extensa y se encuentra mayoritariamente en tejido neural, mientras que la presencia de los m_5 parece coincidir con las regiones cerebrales de los m_1 , m_3 y m_4 (BONNER y col., 1989; HULME y col., 1990). En células endoteliales frescas aisladas de aorta bovina, se ha identificado el ARNm de m_1 , m_2 y m_3 y en células del músculo liso vascular el ARNm de m_1 y m_3 , mediante el uso de sondas de ADNc complementario para las regiones no-conservadas de los receptores m_1 - m_5 (TRACEY y PEACH, 1992). Por otro lado, solo se identificó el ARNm para los receptores m_2 en cultivos de células endoteliales (TRACEY y PEACH, 1992).

El efecto cronotrópico negativo de la ACh sobre la aurícula, se ha usado como un modelo para desarrollar antagonistas muscarínicos selectivos para los receptores M_2 (EGLEN y WHITING, 1986). En contraste, la respuesta contráctil para la estimulación colinérgica en arterias grandes o epicárdicas bovinas y porcinas está mediada a través de un receptor del subtipo M_3 (DUCKLES, 1988,

Tabla I. Características de los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos. Modificado de "Receptor Nomenclature supplement", TIPS, 1994 y de HULME y col., 1990.

RECEPTORES COINERGICOS MUSCARINICOS

Nomenclatura	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	-
Nomenclatura previa	M _{1α}	M _{2α} M ₂ cardíaco	M _{2β} M ₂ glandular	-	-
Gen	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅
Agonista selectivo	-	-	-	-	-
Antagonistas selectivos *	pirencepina telencepina	AFDX 116 metroctramina himbacina	pFHHSiD HHSiD 4-DAMP	Tropicamida	-
Radio-ligandos	[³ H]- pirencepina	-	-	-	-
Acoplamiento	IP ₃ /DAG ↑	AMPc ↓ Canal K (G) ↑	IP ₃ /DAG ↑	AMPc ↓	IP ₃ /DAG

Hay que destacar el hecho de que no existen agonistas selectivos para los receptores muscarínicos.

* Ninguno de los antagonistas tiene una potencia 10 veces mayor para un subtipo de receptores que para los demás.

El acoplamiento indica el mecanismo predominante aunque los receptores pueden acoplarse con otros mediadores.

1990; DUCKLES y GARCIA-VILLALON, 1990; BRUNNER y col., 1991a; VAN CHARLDORP y VAN ZWIETEN, 1989; ENTZEROTH y col., 1990) y la respuesta relajante muscarínica dependiente del endotelio en las arterias coronarias bovinas también parece estar mediada por un receptor del subtipo M_3 (BRUNNER y col., 1991b). La mayoría de los estudios sobre caracterización de receptores muscarínicos en la circulación coronaria se han concentrado en las arterias grandes o proximales. Recientemente, se ha sugerido que existe una distribución heterogénea de los receptores muscarínicos en el lecho vascular cerebral (GARCIA-VILLALON y col., 1990) y a pesar de que se ha demostrado que diferentes receptores muscarínicos intervienen en la redistribución del flujo sanguíneo coronario (PELC y col., 1988), no existen estudios funcionales acerca de los receptores muscarínicos en las arterias intramiocárdicas.

En base a la afinidad de los diferentes antagonistas selectivos de los receptores muscarínicos para desplazar radioligandos del músculo liso coronario porcino, se ha descrito una población homogénea de receptores con valores para los antagonistas distintos a los que anteriormente se habían descrito como selectivos para M_1 , M_2 o M_3 (RINNER y col., 1988). Por otro lado, otros autores encontraron una población heterogénea de receptores muscarínicos con características similares a los subtipos M_1 y M_3 (YAMADA y col., 1988). Finalmente, se han publicado dos estudios realizados en el músculo liso coronario demostrando una población mixta de receptores M_2 y M_3 . Los experimentos funcionales en las mismas preparaciones sólo indican una contribución de los receptores M_3 en la respuesta contráctil (ENTZEROTH y col., 1990; BRUNNER col., 1991a). Aparte de los receptores

muscarínicos en el músculo liso y endotelio de la circulación coronaria, probablemente existan receptores muscarínicos que regulan la liberación presináptica de ACh (autorreceptores) o la liberación de otros neurotransmisores (heterorreceptores). De este modo, se ha descrito una inhibición de la liberación de ACh marcada en corazones aislados perfundidos de rata y se ha sugerido que la autoinhibición podría estar mediada por un receptor muscarínico del subtipo M_2 , en contraste con el efecto facilitador de los receptores nicotínicos (BOGNAR y col., 1990), pero no existen estudios de este tipo en la circulación coronaria aislada. Sin embargo, en arterias coronarias proximales caninas se ha descrito la inhibición por ACh de la liberación de noradrenalina tritiada mediante estimulación eléctrica, pero no se ha identificado el subtipo de receptor muscarínico (COHEN y col., 1984a). En la aurícula aislada y estimulada eléctricamente, se han observado tanto autorreceptores inhibitorios del subtipo M_2 como receptores M_1 que facilitan la liberación de noradrenalina tritiada. El último efecto fue antagonizado por atropina (COSTA y MAJEVSKI, 1991). En otros lechos vasculares, se ha descrito que tanto la autoinhibición como la inhibición de noradrenalina por receptores muscarínicos está mediada a través de receptores de los subtipos M_2 y M_3 (ALONSO y col. 1991; FERRER y col. 1992). Sin embargo, en los últimos estudios también hay que tener en cuenta que factores liberados de las células endoteliales podrían influir en la liberación de neurotransmisores, y no necesariamente existe una población mixta de receptores muscarínicos presinápticos.

1.3.2 Receptores nicotínicos

Los receptores nicotínicos de los ganglios autónomos y del músculo esquelético son diferentes. La nicotina estimula los dos subtipos de receptores mientras que el dimetilfenilpiperazinium (DMPP) es un agonista selectivo para los ganglios autónomos 2 ó 3 veces más potente que la nicotina (CHEN y col., 1951), y el tetraetilamonio (TEA), el trimetafán y el hexametonio son bloqueantes selectivos de los ganglios. La transmisión ganglionar es complicada por la presencia de receptores muscarínicos además del receptor principalmente nicotínico.

Inicialmente, la respuesta vasopresora observada con la inyección de nicotina fue atribuida a la estimulación de los ganglios simpáticos, pero más tarde se ha considerado que la liberación de noradrenalina como vasoconstrictor podría ser debida a un efecto más periférico que la acción de la nicotina en los ganglios simpáticos. La nicotina causó vasoconstricción en la mayoría de las preparaciones vasculares, a través de un efecto presináptico liberando noradrenalina de los terminaciones nerviosas simpáticas. De este modo, se ha demostrado que en la arteria de la oreja y en las arterias pulmonar y meséptica, la nicotina a concentraciones entre 1 y 100 μM causa contracciones sensibles a la fentolamina y libera noradrenalina tritiada ($^3\text{H-NA}$) (NEDERGAARD, 1988). Este último efecto fue inhibido por el antagonista hexametonio. La acción de la nicotina es estereoselectiva, dado que en contraste con la forma isomérica negativa, la forma positiva no causó contracción o liberación de noradrenalina tritiada en la arteria pulmonar de conejo (IKUSHIMA y col., 1982).

La incubación en un medio libre de calcio o con antagonistas de calcio bloqueó la liberación de $^3\text{H-NA}$, sugiriendo que el efecto inducido por la nicotina depende de la entrada de calcio extracelular, seguida de la liberación exocitótica de noradrenalina (NEDERGAARD, 1988). La tetrodotoxina (TTX), inhibidor selectivo de los canales de sodio voltaje-dependientes de los nervios, que suprime sus potenciales de acción, bloqueó las contracciones inducidas por la nicotina en la arteria de la oreja del conejo y en las arterias femoral y mesentérica del perro (BELL, 1968; TODA y col., 1976), mientras que la TTX no tuvo ningún efecto sobre las contracciones inducidas por la nicotina en la arteria pulmonar del conejo (IKUSHIMA y col., 1981). El hecho de que el mecanismo de la nicotina puede ser diferente en distintas preparaciones, se ha confirmado por la observación de que la 4-aminopiridina, que es un agente que inhibe la conductancia de potasio y prolonga el potencial de acción en células excitables, no alteró la respuesta contráctil para la nicotina en la arteria pulmonar.

La nicotina induce una respuesta transitoria postsináptica simpaticomimética en muchos vasos sanguíneos, y a pesar de su presencia continua en la solución del baño, la respuesta no es mayor al incrementar la concentración de nicotina. Este estado se denomina desensibilización (STEINSLAND y FURCHGOTT, 1975) y no es debido a la deplección de noradrenalina, ya que la estimulación eléctrica persiste y además está aumentada. Sin embargo, cuando se cambia la solución del baño, los vasos recuperan poco a poco su sensibilidad para la nicotina (STEINSLAND y FURCHGOTT, 1975).

En arterias cerebrales y coronarias caninas, la nicotina no causó contracción sino una relajación sensible al hexametonio (TODA y HAYASHI, 1982; TODA y col., 1993). En las arterias cerebrales se ha demostrado recientemente que dicha relajación se debe al NO liberado de nervios nitrérgicos (TODA y col., 1993). En arterias coronarias epicárdicas, una parte de la relajación puede ser debida a la liberación de noradrenalina de terminaciones nerviosas simpáticas (TODA y HAYASHI, 1982), mientras que la parte residual de esta relajación transitoria en preparaciones de animales tratados con reserpina fue potenciada por fisostigmina e inhibida por atropina, sugiriendo que la nicotina causa liberación de una sustancia con características de ACh liberada de nervios de las arterias coronarias (TODA y HAYASHI, 1982). Por otro lado, en perros anestesiados, la infusión de nicotina causó una vasodilatación seguida de vasoconstricción en los vasos coronarios de resistencia, mientras que solo indujo vasodilatación en las arterias coronarias grandes. El bloqueo de los receptores muscarínicos no alteró la respuesta para la nicotina, mientras que el bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos inhibió la vasodilatación. La respuesta vasoconstrictora fue inhibida por antagonistas de los receptores alfa₁ y alfa₂ (WOODMAN, 1990). En terneras conscientes, la infusión de nicotina causó una respuesta bifásica, constituida por una vasoconstricción seguida de vasodilatación que no fue alterada por la presencia de bloqueantes alfa- y beta-adrenérgicos. Sin embargo, las dos respuestas fueron antagonizadas por la presencia de atropina o hexametonio, sugiriendo que en esta especie, la nicotina localmente estimula los nervios parasimpáticos y causa constricción de la circulación coronaria (YOUNG y col., 1988). En conjunto, los estudios sobre la acción de la nicotina en la circulación coronaria indican que este agente es capaz

de liberar noradrenalina o ACh mediante una acción presináptica sobre nervios simpáticos (heterorreceptores) o parasimpáticos (autorreceptores), respectivamente. En arterias coronarias aisladas, sin influencia del miocardio, existen pocos datos sobre los efectos de la nicotina.

1.4 Mecanismos que intervienen en las respuestas a la acetilcolina

Como se ha descrito anteriormente, se han observado dos efectos postsinápticos de la ACh en preparaciones vasculares. En primer lugar, la ACh puede inducir una contracción directa activando receptores muscarínicos en el músculo liso, o indirecta a través de la liberación de factores contráctiles del endotelio (eicosanoides, factor contráctil derivado del endotelio). En segundo lugar, la ACh puede producir vasodilatación del músculo liso a través de la liberación de factores relajantes del endotelio (eicosanoides, factor relajante derivado del endotelio, factor hiperpolarizante derivado del endotelio). También se ha observado una vasorrelajación directa del músculo liso inducida por la ACh, aunque el mecanismo es desconocido (BRAYDEN y BEVAN, 1985; BRAYDEN y LARGE, 1986; NEILD y col., 1990).

Tanto las respuestas contráctiles como las relajantes inducidas por la ACh en preparaciones vasculares están mediadas por receptores muscarínicos acoplados a distintos tipos de proteínas G, que fijan los nucleótidos de guanina y constituyen una unidad de transducción a través de la membrana. Los receptores m_2 y m_4 están acoplados a la proteína G_i o G_o , sensible a la ADP-ribosilación por la toxina del

Pertussis, que induce inhibición de la enzima adenilato ciclasa y reduce las concentraciones de AMPc (Tabla I). Los receptores m_1 , m_2 y m_3 están acoplados a la proteína G_p , insensible a la acción de la toxina del Pertussis. La ocupación de un receptor acoplado a la proteína G_p induce un cambio en la conformación de la proteína G que se transmite a los lazos intracelulares donde éstos se disocian en las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$ que podrían activar diferentes isoenzimas de la fosfolipasa C, que a su vez activa la hidrólisis del inositol bifosfato en fosoinositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (1,2-DAG) (Peralta y col., 1987). La subunidad G_{α} intercambia GDP por GTP antes de activar la fosfolipasa C. El proceso se detiene cuando el GTP es hidrolizado a GDP por una GTPasa asociada a la subunidad alfa que se recombina con la subunidad $\beta\gamma$ para formar un complejo inactivo (BERRIDGE, 1993).

Los distintos subtipos de receptores muscarínicos están acoplados a diferentes sistemas efectores. Sin embargo, se ha demostrado que un único subtipo de receptores puede mediar varias respuestas intracelulares independientes. Así, los receptores m_2 pueden inhibir la adenilato ciclasa, abrir canales de potasio y estimular la hidrólisis de inositol bifosfato (PFAFFINGER y col., 1985; ASHKENAZI y col., 1987; NATHANSON, 1987). Otro ejemplo que indica varios efectos de un mismo subtipo de receptor, es el estudio del receptor muscarínico M_3 en el músculo circular del estómago de cobaya, donde dicho receptor está probablemente conectado a tres diferentes mecanismos de transducción. Causa liberación de calcio por la vía de la fosfolipasa C e inositol trifosfato (IP_3), influjo de calcio a través de canales voltaje-dependientes (sensibles a nifedipina) e influjo

de calcio a través de una vía no sensible a la nifedipina (PAREKH y BRADING, 1992).

1.4.1 Regulación de la contracción del músculo liso coronario

APARATO CONTRACTIL

En el músculo liso vascular, como en el músculo esquelético, la contracción o desarrollo de tensión está producido por un incremento de la concentración citosólica de calcio libre (ITOH y col., 1985; KAMM y STULL, 1989; JENSEN y col., 1993a,b), seguido del deslizamiento interconectado de los filamentos de miosina y actina (LOWY y col., 1970; ASHTON y col., 1975).

Los haces de miofilamentos tienen cuerpos densos de alfa-actina, anclados por una red de fibras de un tamaño intermedio, constituyendo así un citoesqueleto. Los cuerpos densos probablemente juegan el mismo papel que las líneas Z en el músculo esquelético. Cada unidad contráctil contiene varios filamentos de miosina, cada uno de ellos interconectado con varios filamentos de actina (10-15). Los filamentos de actina orientados diagonalmente están insertados en los cuerpos densos de alfa-actina o en la membrana plasmática, en puntos especializados que conectan varios grupos de células.

Una molécula de miosina consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de miosina (MLC). La fosforilación de la MLC por la quinasa de la cadena ligera de

miosina (MLCK), permite la combinación de actina-miosina mediante puentes cruzados cíclicos ("cross-bridges"), la expresión de la actividad de la actomiosin-ATPasa y llevar a cabo el deslizamiento (Fig. III, KAMM y STULL, 1985; HARTSHORNE, 1987). La MLCK es activada por el complejo calcio-calmodulina y empieza cuando la concentración citosólica de calcio supera $10^{-7}M$, mientras que la contracción máxima se observa con una concentración de $10^{-6}M$. La fosforilación de la miosina e hidrólisis de ATP es mucho más lenta en el músculo liso vascular, comparado con el músculo liso esquelético, dando lugar a un ciclo de puentes cruzados más lento. Cuando la concentración de calcio citosólico disminuye por debajo de $10^{-7}M$, la MLCK se inhibe y la miosina es defosforilada originando una inhibición de la miosina-ATPasa. La defosforilación es llevada a cabo por la enzima fosfatasa de la miosina (MLCP), que es activa constantemente e independiente de la concentración de calcio (DISALVO y col., 1983).

Parece ser que el desarrollo de la fuerza y la actividad de la ATPasa pueden estar regulados por la fosforilación/defosforilación, mientras que los mecanismos implicados en el mantenimiento de una fuerza sostenida actualmente no están claros, debido a las observaciones de que una fuerza puede ser sostenida durante tiempo prolongado a pesar de que el incremento en la concentración de calcio intracelular es transitorio con cambios en la relación fuerza/ $[Ca^{2+}]_i$ sin cambios en el tono vascular (MORGAN y MORGAN, 1984). Igualmente, se ha observado que los niveles de fosforilación de la miosina vuelven a valores bajos poco después de la estimulación, a pesar de que el tono vascular se mantiene (RÜEGG, 1992). Para explicar estas observaciones se han propuesto varios teorías:

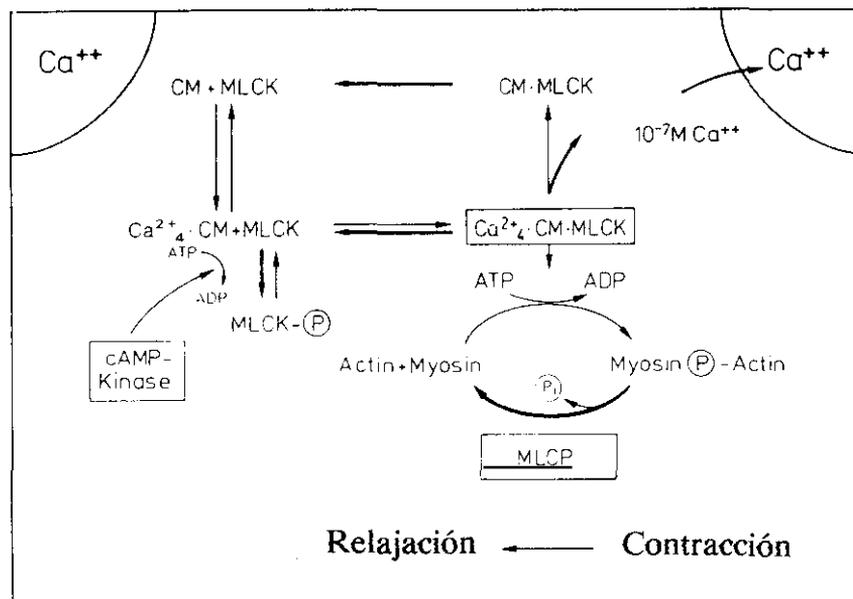
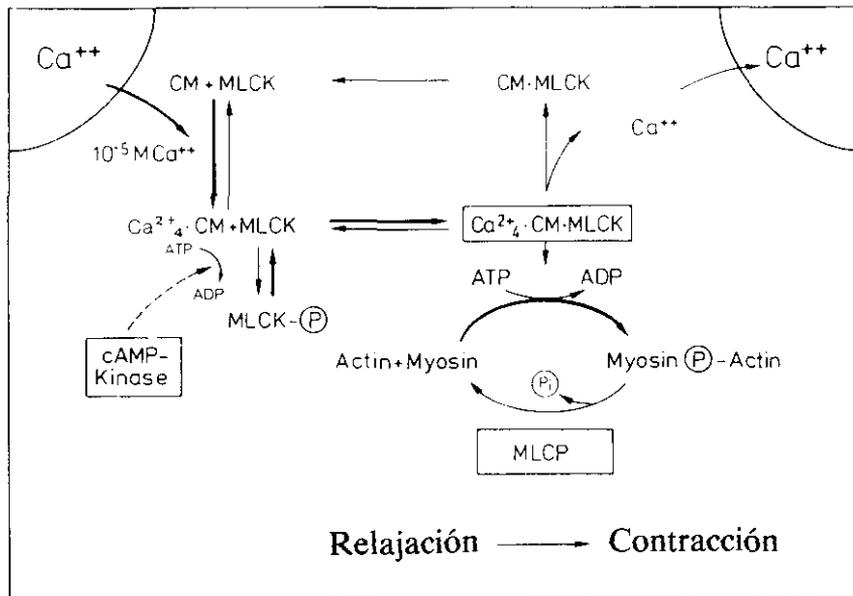


Figura III. Ciclo contracción-relajación en el músculo liso vascular. (a) La fosforilación de la miosina regula la contracción del músculo liso vascular. La activación es iniciada mediante la acción del complejo constituido por calcio, quinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK) y calmodulina (CM) que fosforila las cadenas ligeras de miosina (MLC). (b) Cuando disminuye la concentración de calcio por debajo de $0.1 \mu M$, el complejo calmodulina-MLCK se descompone y la miosina es desfosforilada por la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCP). MLCK también puede ser inactivada por la proteína quinasa A dependiente de AMPc que forma la MLCK-P (la MLCK fosforilada en dos sitios). Modificado de KAMM y STULL (1985).

(1) A través de una proteína G, un agonista puede incrementar la contractilidad del músculo liso por medio de una sensibilización de la respuesta al calcio, sin alterar las concentraciones citosólicas de calcio libre. El mecanismo es independiente de la concentración de calcio y podría ser atribuido a una inhibición de la MLCP induciendo un incremento de la fosforilación de la MLC y de la contracción (KITAZAWA y col., 1991; RÜEGG, 1992; GONG y col., 1992).

(2) La hipótesis de los "latch-bridges" propone que tras un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) seguidos de un desarrollo de fuerza, después de la defosforilación de las cabezas de miosina (puentes cruzados), algunos de los complejos de actomiosina siguen conectados y sostienen la contracción y eso explica porqué la fuerza se mantiene a pesar de que los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y fosforilación bajan (DILLON y col., 1981; HAI y MURPHY, 1988). Recientemente, se ha observado en preparaciones permeabilizadas con la alfa-toxina de estafilococos, que este estado podría ser debido a una inhibición de la liberación de ADP del complejo de actomiosina, que causa un incremento en la sensibilidad para el calcio de los miofilamentos y explica así que la contracción se sostiene a pesar de que la concentración citosólica de calcio está disminuida (NISHIMURA y VAN BREMEN, 1991).

(3) Un tercer mecanismo que se ha sugerido en ausencia de fosforilación adicional de la miosina, puede estar regulado por las proteínas tropomiosina, caldesmon y calponina que han sido encontradas además de la actina en los filamentos finos. El caldesmon y la calponina inhiben la actividad de la ATPasa de la actomiosina, pero

la inhibición cesa si estas proteínas son fosforiladas (SUTHERLAND y WALSH, 1989; TAKAHASHI y col., 1988). Así, un incremento en el reciclaje de calcio a través de un influjo de calcio por canales voltaje-dependientes, y la activación de la bomba de calcio en la membrana y de la proteína quinasa C seguida de la fosforilación de los componentes proteicos del filamento fino pueden conducir a un tono sostenido sin fosforilación adicional de la miosina. Sin embargo, la fosforilación de la tropomiosina por una proteína quinasa dependiente de la calmodulina incrementa la sensibilidad para el calcio de los miofilamentos y mejora el acoplamiento fosforilación-contracción (RÜEGG, 1992).

Actualmente, la mayoría de los mecanismos sobre la contracción se han obtenido de datos procedentes de células de músculo liso de vasos de gran tamaño y existe escasa información sobre los proteínas aisladas de células del músculo liso de arterias de resistencia.

HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

Las concentraciones de calcio citosólico libre dependen de un balance entre la entrada o liberación y recaptación de calcio. Las concentraciones de calcio medidas con Fura-2 o microelectrodos sensibles al calcio, indican que las concentraciones intracelulares, $[Ca^{2+}]_i$, están en el rango de $10^{-7}M$ en el músculo liso vascular en reposo (WILIAMS y col., 1985; HIMPINS y col., 1988; FUJINO y col., 1991; JENSEN y col., 1992), mientras que las concentraciones extracelulares están alrededor de $1.5 \times 10^{-3}M$; por tanto, existe un gradiente químico y eléctrico (el

potencial de equilibrio está cerca de -60 mV) del calcio con orientación hacia el interior de la célula (VAN BREMEN y col., 1985).

Tanto en arterias de resistencia sistémicas como coronarias, diversos agonistas solo causan una respuesta transitoria en un medio libre de calcio y el desarrollo de respuestas sostenidas es dependiente de la presencia e influjo de calcio extracelular (MULVANY y NYBORG, 1980; CAUVIN y col., 1984; NYBORG y MIKKELSEN, 1987).

La concentración intracelular de calcio, $[Ca^{2+}]_i$, en las arterias de resistencia como en otros tipos de músculo vascular puede ser incrementada por el influjo de calcio a través de canales de calcio dependientes del potencial de membrana (PDC) que son bloqueados selectivamente con antagonistas de calcio de la familia de las dihidropiridinas (tipo L) o con cloruro de cadmio (tipo T) (MULVANY y NYBORG, 1980; PRIETO y col., 1993), por el influjo de calcio a través de canales de calcio operados por receptor (RDC) (BOLTON, 1979) o por el influjo de calcio activado por segundos mensajeros, como el calcio liberado de depósitos intracelulares por IP_3 (BERRIDGE, 1993). La liberación de calcio de depósitos intracelulares como el retículo sarcoplasmático, la membrana plasmática o las mitocondrias también puede contribuir al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. La liberación de calcio del retículo sarcoplasmático se lleva a cabo mediante la acción de segundos mensajeros como el IP_3 o el propio calcio ("liberación de calcio inducida por calcio") (IINO, 1990; BERRIDGE, 1993).

La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ después de la estimulación, se lleva a cabo por una bomba de calcio-ATPasa de la membrana plasmática dependiente de la calmodulina, que expulsa el calcio al espacio extracelular (KWAN y col., 1979, 1984; WUYTACK y CÀSTEELS, 1980), o bien el calcio es devuelto al retículo sarcoplasmático por medio de bombas de calcio (RAEYMAKERS y col., 1980; WUYTACK y col., 1984; GROVER y KWAN, 1984). En casos de concentraciones elevadas de calcio intracelular, el calcio también puede ser expulsado a través del intercambiador sodio/calcio por el gradiente de sodio que se mantiene con la bomba de sodio-potasio-ATPasa (OZAKI y URAKAWA, 1981). La recaptación de calcio por las mitocondrias sólo se produce a concentraciones muy elevadas ($10^{-5}M$) y no fisiológicas de $[Ca^{2+}]_i$ (MISSIAEN y col., 1991).

EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y LA CONTRACCION

El potencial de membrana (E_m) en el músculo liso de vasos coronarios intactos se ha descrito ser en un rango de -44 a -55 mV en arterias coronarias de cobaya (ITO y col., 1979; KEEF y BOWEN, 1989), de -44 a -51 mV en el cerdo (ITOH y col., 1982; BÉNY y BRUNET, 1988b), de -49 a -55 mV en el perro (ILLIANO y col., 1992), de -40 mV en monos y -62 mV en humanos (ANGUS y col., 1991b). Parece ser que no existen diferencias en el potencial de membrana entre partes proximales y distales de la circulación coronaria, en presencia o ausencia de la capa endotelial (FELETEU y VANHOUTTE, 1988; KEEF y BOWEN, 1989).

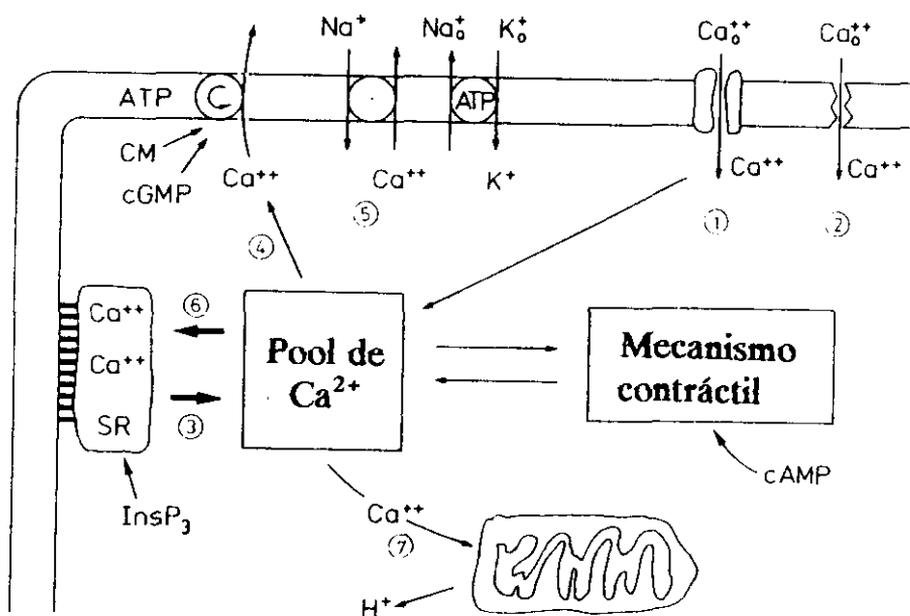


Figura IV. Resumen de la homeostasis del calcio en el músculo liso vascular. Los niveles de calcio dependen del balance entre la liberación y recaptación. La entrada de calcio del espacio extracelular ocurre a través de canales operados por voltaje o receptor (1,2) y la liberación del retículo sarcoplasmático contribuye también al incremento del Ca²⁺ citoplasmático (3). La retirada de calcio del citoplasma es efectuada por una bomba en el retículo sarcoplasmático (6) o membrana plasmática (4) o el intercambiador sodio-calcio (5), mientras que la recaptación de calcio por las mitocondrias no es considerada de importancia fisiológica (7). Modificado de RÜEGG (1992).

En contraste con el músculo esquelético y tejido nervioso, el influjo de corriente durante un potencial de acción en el músculo liso se debe al influjo de iones de calcio (HOLMAN, 1958; BÜLBRING y KURIYAMA, 1963). En vasos de resistencia, existen canales de calcio voltaje-dependientes que se abren con la despolarización, originando potenciales de acción (HIRST, 1977; ANGUS y col., 1988; HIRST y EDWARDS, 1989). Sin embargo, la activación de los canales de calcio en arterias de resistencia, en muchas ocasiones sólo da lugar a pequeños cambios en el potencial de membrana que no son comparables con potenciales de acción, a pesar de que inducen contracción. Esto puede ser debido a los siguientes hechos:

- (1) Existe una activación simultánea de los canales de potasio, inducida por el incremento en la concentración de calcio intracelular, que limita los cambios en el potencial de la membrana (HIRST y col., 1986; BOLTON y LARGE, 1986).
- (2) No existe un umbral para la activación de los canales de calcio. El influjo de calcio a través de un canal de calcio voltaje-dependiente es determinado, y una despolarización pequeña (10-20 mv) sin generación de potenciales de acción puede conducir a un influjo de calcio suficiente para llevar a cabo la contracción (NELSON y col., 1991).
- (3) Las células del músculo liso están acopladas eléctricamente a través de "uniones estrechas", lo cual permite flujos de iones entre las células con pequeños cambios en el potencial de membrana en lugar de transporte transmembrana (HIRST y EDWARDS, 1989).

La ACh produce constricción acompañada de un incremento en la descarga de

espigas o despolarización lenta de la membrana, en la mayoría de las preparaciones de músculo liso vascular (FUNAKI y BOHR, 1965; SU y BEVAN, 1965). Sin embargo, la acción directa de la ACh sobre el músculo liso vascular depende de la especie animal y el tipo de vaso estudiado. La ACh induce contracción sin cambios en el potencial de membrana en arterias coronarias grandes porcinas (ITO y col., 1979; ITOH y col., 1982), mientras que una concentración de 10^{-6} M causa despolarización sostenida (20 mV) en arterias coronarias porcinas pequeñas aisladas de la aurícula o del ventrículo izquierdo (ANGUS y col., 1991b) y también en aorta de conejo en ausencia del endotelio (BÉNY y BRUNET, 1988a). En arterias coronarias humanas pequeñas, la ACh también causa una despolarización rápida del potencial de membrana, seguida de una repolarización, acercándose al potencial de membrana en reposo, E_m , antes de que el vaso se despolarizare otra vez y produciendo así oscilaciones en el potencial de membrana (ANGUS y col., 1991b).

La naturaleza del mecanismo que induce la despolarización en respuesta a la ACh en arterias coronarias pequeñas del cerdo o del hombre no se conoce y contrasta con la falta de cambios en el potencial de membrana observada en las arterias coronarias grandes. Sin embargo, HIRST y EDWARDS (1989) sugirieron que una despolarización pequeña podría ser debida a la sumación de potenciales postsinápticos excitadores durante la actividad de nervios vasoconstrictores y así dar lugar al influjo de calcio a través de los canales voltaje-dependientes.

La ACh no origina cambios en el potencial de membrana en arterias coronarias proximales porcinas, pero induce una contracción que persiste en una solución libre

de calcio (ITO y col., 1979; ITOH y col., 1982). Esto sugiere que la contracción inducida por la ACh no depende del influjo de calcio extracelular. Sin embargo, en la misma preparación otros investigadores han descrito que los antagonistas de calcio de los canales voltaje-dependientes inhiben la respuesta contráctil a la ACh, aunque las concentraciones de antagonistas usadas fueron muy elevadas (10^{-6} - 10^{-5} M de nifedipina) (FLECKENSTEIN y col., 1983) y la inhibición observada podría ser debida a un efecto intracelular de los antagonistas (CHURCH y ZOSTER, 1980). Además, la ACh causa hidrólisis del fosfoinositol bifosfato (PIP_2) en arterias coronarias de cerdo (ITOH y col., 1988) y liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (KATSUYAMA y col., 1991). Considerando también los estudios de caracterización de receptores muscarínicos, todo indica que la ACh induce contracción a través de un receptor muscarínico del subtipo M_3 acoplado a una proteína G con activación de la fosfolipasa C e hidrólisis del PIP_2 a IP_3 ; el IP_3 induce la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático y el diacilglicerol activa la proteína quinasa C (ITOH y col., 1988; ENZTEROTH y col., 1990; KATSUYAMA y col., 1991).

El mecanismo de contracción inducido por la ACh en arterias coronarias pequeñas no ha sido estudiado, y como indican las medidas de potencial de membrana, podrían existir marcadas diferencias en el acoplamiento excitación-contracción con respecto a las arterias proximales o de conducción.

MECANISMOS DE RELAJACION DE LAS ARTERIAS CORONARIAS A NIVEL DE MUSCULO LISO

Siguiendo el modelo sobre los mecanismos implicados en la contracción del músculo liso vascular (Figura III), una inhibición de la activación de estos mecanismos o relajación del músculo liso, hipotéticamente se puede producir de las siguientes maneras:

(1) Interacción con el aparato contráctil y, específicamente, una disminución de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC).

(2) Interacción con los mecanismos que regulan la concentración citosólica de calcio libre. Se han descrito varios mecanismos fisiológicos para explicar la relajación. En primer lugar, una reducción en los niveles de oxígeno, hipoxia, inducida por la inhibición del metabolismo oxidativo, que reduce la excitación de la membrana y la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina sin causar cambios sustanciales en la $[Ca^{2+}]_i$, probablemente debido a la dependencia energética de ATP de estos procesos (SWÄRD y col., 1993). En segundo lugar, se ha demostrado que la hiperpolarización de la membrana induce relajación, en la mayoría de los vasos a través de la apertura de canales de potasio, lo que cierra los canales voltaje-dependientes y disminuye la $[Ca^{2+}]_i$. En el músculo liso vascular se han caracterizado por lo menos dos tipos de canales de potasio con importancia en la hiperpolarización (NELSON y col., 1991): (1) Canales de potasio sensibles al ATP, K_{ATP} , que se abren específicamente con cromakalina, pinacidil, diazoxide y nicorandil y que se inhiben con glibenclamida ($10^{-5}M$) y bario ($10^{-4}M$). (2) Canales de potasio activados por el calcio intracelular y que son inhibidos por

charibdotoxina y bajas concentraciones de tetraetilamonio (10^{-4}M).

El tercer mecanismo que puede causar relajación arterial está mediado por el adenosín 3',5 monofosfato (AMPc). El AMPc se forma a partir del ATP por una reacción catalizada por la enzima de membrana, adenilato ciclasa. La activación de la adenilato ciclasa está regulada por dos proteínas G: (1) Una proteína G_A estimuladora de la enzima y acoplada a un receptor. El ejemplo clásico de este acoplamiento es el receptor beta-adrenérgico. (2) Una proteína inhibidora, G_i , de la adenilato ciclasa también acoplada a un receptor, por ejemplo la del receptor muscarínico del subtipo M_2 . Las concentraciones de AMPc también están reguladas por fosfodiesterasas que metabolizan el AMPc en AMP. La forskolina activa la adenilato ciclasa mientras que la papaverina inhibe las fosfodiesterasas. El AMPc activa una proteína quinasa dependiente del AMPc (proteína-quinasa A), discociando la enzima en una unidad reguladora y otro catalítica que causa fosforilación (NIMMO y COHEN, 1977; SILVER y col., 1982). El efecto principal de la proteína quinasa dependiente del AMPc es la fosforilación de la MLCK, y por tanto, la inhibición de este enzima disminuye la fosforilación de la MLC (ADELSTEIN y HATHAWAY, 1979; DELANEROLLE y col., 1984); sin embargo la quinasa dependiente del AMPc, también a través de fosforilación, puede reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por una de las siguientes vías: (1) Inhibición del influjo de calcio a través de canales voltaje-dependientes (MEISHERI y VAN BREMEN, 1982). (2) Estimulación de la sodio-potasio-ATPasa con incremento en el intercambio de sodio-calcio (SCHEID y col., 1979). (3) Estimulación de la bomba de calcio en el retículo sarcoplasmático (MUELLER y VAN BREMEN, 1979).

Otro segundo mensajero que también media la relajación del músculo liso vascular es el guanosín monofosfato cíclico, GMPc. El GMPc se forma a partir de GTP por una reacción catalizada por la hemoproteína, guanilato ciclasa soluble, en el citoplasma, o por la guanilato ciclasa particulada en la membrana. La primera enzima es activada por el factor relajante derivado del endotelio y por nitrovasodilatadores (GRUETER y col., 1981a,b; HOLZMAN, 1982; RAPOPORT y MURAD, 1983), mientras la enzima de la membrana es activada por el factor natriurético auricular (ANF) (WINQUIST y col., 1984). El GMPc es metabolizado por fosfodiesterasas y activa una proteína quinasa dependiente del GMPc, que al igual que ocurre con el AMPc, ejerce sus acciones a través de la fosforilación de proteínas, aunque todavía no está claro a través de qué mecanismos induce la relajación. En ausencia de calcio y calmodulina, la quinasa dependiente del GMPc causa la fosforilación de la MLCK (DRAZNIN y col., 1983; NISHIKAWA y col., 1984), pero en presencia de Ca^{2+} /calmodulina esta fosforilación es inhibida, lo que sugiere que el GMPc no causa relajación a través de la fosforilación de la MLCK (KAMM y STULL, 1989). Sin embargo, incrementos en la concentración de GMPc pueden inducir relajación a través de la disminución de las concentraciones de calcio: (1) El GMPc estimula la recaptación de calcio por la bomba de calcio en el retículo sarcoplasmático (POPESCU y col., 1985; TWART y VAN BREEMEN, 1988). (2) Estudios con $^{45}Ca^{2+}$ en preparaciones vasculares o células aisladas, han demostrado que agonistas que estimulan el GMPc también incrementan el eflujo de calcio a través de un incremento en la actividad de la bomba Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, y no a través del intercambio sodio-calcio (ITOH y col., 1985; POPESCU y col., 1985; FURUKAWA y col., 1988).

1.4.2 Regulación endotelial de la circulación coronaria

El revestimiento vascular del endotelio como una capa monocelular en todo el sistema circulatorio, no solo representa una barrera de difusión sino también un órgano (1-1.5 kg) con una variedad de funciones que incluyen propiedades antitrombogénicas, metabolismo de noradrenalina, serotonina, nucleótidos de adenina, la conversión de angiotensina I y la metabolización de la bradiquinina por la enzima de conversión de angiotensina (ECA) y otras peptidasas con importancia en el metabolismo de la sustancia P (FURCHGOTT y VANHOUTTE, 1989). Además, con el descubrimiento hecho por FURCHGOTT y ZAWADAZKI (1980) de la dependencia del endotelio de la relajación para la ACh, se reconoció que el endotelio juega un papel importante en la modulación del tono vascular local, no solo a través de la liberación del factor relajante derivado del endotelio (EDRF), sino también de un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), además de la liberación de eicosanoides vasodilatadores y vasoconstrictores (BOEYNAEMS, 1988) y péptidos vasoconstrictores y vasodilatadores como las endotelinas (YANAGISAWA y col., 1988), sustancia P (MILLNER y col., 1989; LOESCH y col., 1993) y vasopresina (LOESCH y col., 1993).

Se piensa que el endotelio juega un papel importante en la distribución del flujo sanguíneo miocárdico, a través de la regulación paracrina que ejerce sobre el tono muscular vascular (ANGUS y COCKS, 1989; BASSENGE y HEUSCH, 1990) y el control de la contractilidad del propio miocardio a través de factores endoteliales

liberados por el endocardio (BRUTSAERT y col., 1988; BRUTSAERT, 1989; KAI y col., 1993). Debido al "shear stress" mecánico (rozamiento ejercido por el flujo sanguíneo en la pared vascular), o a la activación de receptores, se liberan tanto factores relajantes como contráctiles de la capa endotelial y así puede regularse el tono de las células musculares.

EICOSANOIDES

Los eicosanoides constituyen una familia heterogénea de derivados con 20 carbonos (eico) como son las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas. Tienen en común que todos están sintetizados a partir de ácidos grasos esenciales y tienen tres, cuatro o cinco uniones dobles. En el hombre el principal precursor, el ácido araquidónico, se libera de fosfolípidos de la membrana como la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol por la acción de la fosfolipasa A₂ y es el paso limitante en la síntesis de estas hormonas derivadas de lípidos. Las vías de la ciclooxigenasa, que da lugar a la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos, de la lipooxigenasa que da lugar a la formación de los leucotrienos y de la monooxigenasa que da lugar a la formación de lipoxinas, están todas presentes en las células endoteliales, a pesar de que la evidencia de la última vía no está tan bien documentada, ya que se ha encontrado actividad de la sintetasa de prostaciclina y no de la monooxigenasa asociada con las enzimas microsomales de P450 en las células endoteliales (DEES y col., 1982; ABRAHAM y col., 1985).

El principal producto de la vía de la ciclooxigenasa en células endoteliales de

arterias es la prostaciclina (PGI_2), al menos en células de arterias grandes o de conducción, mientras que los productos principales de células endoteliales microvasculares son la PGE_2 y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MARCUS y col., 1978; GERRITSEN y CHELI, 1983; SCHRÖR, 1985). Así, en cultivos de células endoteliales microvasculares aisladas del músculo cardíaco del conejo, la producción y liberación de PGE_2 fue mayor que la liberación del metabolito estable de la PGI_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (GERRITSEN y CHELI, 1983). El tromboxano A_2 (TXA_2), es sintetizado mayoritariamente en la media de la pared vascular, (BRUNKWALL y col., 1987), aunque probablemente también puede ser sintetizado en células endoteliales (INGERMAN-WOJENSKI y col., 1981; LIN y col., 1993), a pesar de que se ha descrito recientemente que no había actividad de la sintetasa de tromboxano en células endoteliales, sino únicamente en células sanguíneas adheridas a la pared vascular (BUZZARD y col., 1993). Diversos estudios han sugerido una síntesis de prostaglandinas tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras en células del músculo liso (GOLDSMITH, 1982; TODA y col., 1987). Sin embargo, hay que tener en cuenta que in vivo la mayor producción de tromboxano viene de plaquetas y que la mayor producción de PGI_2 procede de la pared vascular (MONCADA y col., 1976).

El sistema prostaglandinas-tromboxano, probablemente no juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo coronario bajo condiciones fisiológicas (BASSENGE y HEUSCH, 1990), a pesar de que se observa un incremento en la resistencia vascular coronaria después de la inhibición de la ciclooxigenasa (SAKANASHI y col., 1980; EDLUND y col., 1985; HOLTZ y col.,

1984). Parece ser que las prostaglandinas pueden tener un papel en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio en la condición de hipoxia (BUSSE y col., 1984). La PGI_2 y la PGE_2 tienen una acción vasodilatadora potente en preparaciones aisladas de arterias coronarias, causando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc (GORMAN y col., 1977; TATESON y col., 1977; SHIMOKAWA y col., 1988). El TXA_2 y la $PGF_{2\alpha}$ tienen un efecto potente como vasoconstrictores en arterias coronarias grandes y pequeñas (SIMONSEN y col., 1992).

La síntesis de prostaglandinas inducida por estimulación de los nervios parasimpáticos del corazón o por la infusión de agonistas colinérgicos en la circulación coronaria está mediada a través de receptores muscarínicos (JUNSTAD y WENNMALM, 1974; JAISWAL y MALIK, 1988; JAISWAL y col., 1988). En el corazón aislado perfundido de conejo pueden obtenerse incrementos de la PGE_2 y la 6-keto- $PGF_{2\alpha}$ después de la estimulación colinérgica (JUNSTAD y WENNMALM, 1974; JAISWAL y MALIK, 1988; JAISWAL y col., 1988), pero solo se han estudiado los receptores muscarínicos implicados en la formación de PGI_2 en preparaciones de Langendorf (JAISWAL y MALIK, 1988; JAISWAL y col., 1988). Estos autores concluyeron que receptores muscarínicos de los subtipos M_2 y M_3 están mediando el incremento de salida de 6-keto- $PGF_{2\alpha}$ de corazones aislados de conejo y, mientras los receptores M_2 inducen una disminución de la frecuencia cardiaca, el efecto inotrópico negativo y el efecto vasoconstrictor de la ACh, los receptores M_3 probablemente median la vasodilatación de la ACh infundida (JAISWAL y MALIK, 1988; JAISWAL y col., 1988). En arterias

coronarias proximales de primates no humanos, la inhibición de la ciclooxigenasa no afecta la relajación para la ACh, pero inhibe la respuesta contráctil en segmentos sin endotelio (OKAMURA y col., 1989).

La mayor parte de la síntesis de leucotrienos probablemente deriva de la vía de la lipoxigenasa en granulocitos, macrófagos y mastocitos (FAULER y FRÖHLICH, 1989), a pesar de que la enzima 5-lipooxigenasa también se encuentra en células endoteliales (CHAND y ALTURA, 1981; NOLAN y col., 1990; KÄHLER y col., 1993). Los leucotrienos posiblemente no están involucrados en la regulación fisiológica del tono vasomotor coronario, pero parecen jugar un papel en los procesos inflamatorios, como en el caso de la infiltración de leucocitos del miocardio en el desarrollo de un infarto de miocardio (EVERS y col., 1985; BASSENGE y HEUSCH, 1990). Los leucotrienos C₄ y D₄ son constrictores potentes de las arterias coronarias de cerdo in vivo y en el corazón de cobaya aislado in vitro (TOMOIKE y col., 1987; KÄHLER y col., 1993), mientras que se ha observado vasoconstricción y vasodilatación en arterias coronarias de perro y gato (TRACHTE y col., 1979; TAKAHASHI y col., 1985).

Existe escasa información sobre el papel de la vía monooxigenasa P-450 en las arterias coronarias. La síntesis de ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) por la vía de la citocromo P-450 epoxigenasa, estuvo incrementada en arterias coronarias estenóticas comparadas con arterias coronarias caninas normales (ROSOLOWSKY y col., 1990). Estos derivados del ácido araquidónico inducen una relajación independiente del endotelio probablemente debida a la inhibición de la bomba

sodio-potasio ATPasa (SCHWARTZMAN y col., 1985) y de mayor magnitud que las relajaciones para la PGI₂ en arterias coronarias caninas (ROSOLOWSKY y col., 1990).

El papel vasomotor de los metabolitos oxigenados del ácido araquidónico formado en el endotelio arterial coronario es poco conocido y, en especial, la vía monooxigenasa P-450 ha sido poco investigada.

FACTOR RELAJANTE DERIVADO DEL ENDOTELIO (EDRF)

Las células endoteliales contribuyen al control local del diámetro vascular a través de la formación del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1984; FURCHGOTT y VANHOUTTE, 1989) que es una sustancia no-prostanoide y que en la actualidad se identifica como óxido nítrico (NO) (PALMER y col., 1987; IGNARRO y col., 1987) o un análogo que libera NO en las células del músculo liso (MYERS y col., 1990). Actualmente se reconoce que este sistema actúa con un mecanismo de señal célula-a-célula como neurotransmisor (SNEDDON y GRAHAM, 1992; AYAJIKI y col. 1993) o con una función paracrina (MONCADA y col., 1988; IGNARRO, 1990). También se ha sugerido que el EDRF podría actuar como segundo mensajero en neuronas cerebrales (GARTHWAITE y col., 1988; HU y EL-FAKAHANY, 1993) y en tejido vascular mediante liberación fotosensible (VENTURINI y col., 1993).

El EDRF se libera de células endoteliales por mecanismos mediados por receptor o mecanismos no-mediados por receptor, como son incrementos del flujo sanguíneo (FUJI y col., 1991) o de la presión de CO₂ (TIAN y col., 1993; CARR y col., 1993). La presencia de receptores endoteliales muscarínicos, alfa y beta adrenérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos y para angiotensina II, se descubrió por primera vez en cultivos de células endoteliales vasculares, mediante la medida de los niveles de nucleótidos cíclicos (BUONASSISI y VENTER, 1976). Posteriormente, otros tipos de receptores han sido localizados en células endoteliales en cultivo, como los purinoceptores-P_{2X} (BURNSTOCK y KENNEDY, 1985; HOUSTON y col., 1987) y receptores para taquininas (COCKS y col., 1985). El mecanismo de transducción que conduce a la liberación de EDRF de los células endoteliales depende probablemente del influjo de calcio extracelular (LÜCKHOFF y BUSSE, 1986; COLDEN-STANFIELD y col., 1987) y/o la liberación del calcio de reservas intracelulares (LÜCKHOFF y BUSSE, 1986; MÜLSCH y col., 1989). ANGUS y COCKS (1989) indicaron que hay que considerar las células endoteliales como otro tipo de células secretoras que utilizan una sistema dual de segundos mensajeros para regular diversos procesos celulares. De este modo, después de la estimulación de la liberación de EDRF con un agonista, se activa la fosfolipasa C originando la formación de IP₃ y diacilglicerol (DAG); el IP₃ podría causar la liberación de calcio de reservas intracelulares, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C en la membrana plasmática, conduciendo esto último al influjo de calcio extracelular. De acuerdo con esta teoría, se ha demostrado que la bradiquinina libera EDRF e incrementa los niveles de IP₃ en células endoteliales de aorta (LAMBRECHT y col., 1986), y el IP₃

añadido a células endoteliales permeabilizadas químicamente vacía las reservas intracelulares de calcio (JOHNS y col., 1988).

El incremento del calcio intracelular de las células endoteliales causa la activación de la sintasa de óxido nítrico que genera NO y citrulina a partir del grupo guanidino de la L-arginina (BREDT y col., 1991). La enzima, además de calcio, necesita otros cofactores como calmodulina, NADPH y oxígeno para catalizar los dos procesos dando lugar a la formación de NO. La síntesis de NO se puede inhibir con bloqueantes del transportador de L-arginina en las células endoteliales (BOGLE y col., 1992) y también con el uso de análogos de L-arginina, N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) o L-N^G-nitro arginina (LNNA), causando inhibición de la sintasa del óxido nítrico (MOORE y col., 1990; REES y col., 1989a). Igualmente, los inhibidores del metabolismo oxidativo, inhiben selectivamente la liberación de EDRF de las arterias coronarias de conejo (GRIFFITH y col., 1986). Después de su formación, el NO que es altamente difusible, va al espacio extracelular como EDRF en forma de NO puro o como un constituyente con NO, como es la S-nitroso-L-cisteína (IGNARRO, 1990; MYERS y col., 1990; KONTOS, 1993). Después de difundir al músculo liso, el NO se combina con el componente hemo de la enzima guanilato ciclasa y activa esta enzima. La guanilato ciclasa activada genera guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosín trifosfato de magnesio (MgGTP). El GMPc activa la proteína quinasa dependiente del GMPc (RAPOPORT y MURAD, 1983) y conduce a la desfosforilación de las cadenas ligeras de la miosina, causando relajación del músculo liso (BRENNER y col., 1989). Debido a la afinidad del NO por los grupos

hemo, se puede usar oxihemoglobina como "scavenger" (secuestrador) de NO y de este modo causar inhibición de la relajación vascular (MARTIN y col., 1985). Se ha demostrado también que otros antagonistas del NO como el azul de metileno, tienen un efecto directo inhibitorio de la guanilato ciclasa (GRUETTER y col., 1981a,b; MARTIN y col., 1985). Se ha sugerido que el EDRF puede inducir relajación a través de mecanismos independientes del GMPc como son el incremento de la conductancia de potasio (GORDON y MARTIN, 1983), alteración de la actividad de la bomba de sodio-potasio-ATPasa (FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980), efecto sobre el influjo de calcio (EGLEME y col., 1984; GRIFFITH y col., 1986; MALTA y col., 1986) o un efecto directo inhibitorio sobre el mecanismo de contracción del músculo liso (GREENBERG y DIECKE, 1988). Actualmente, continúa la controversia sobre la existencia de uno o dos factores relajantes no-prostanoides derivados del endotelio, uno que causa relajación a través del GMPc (EDRF) y otro hiperpolarización (EDHF).

La conversión de L-arginina a NO en las células endoteliales está mediada por la sintasa constitutiva de óxido nítrico dependiente de calcio y calmodulina, pero se ha identificado la vía L-arginina-NO en el músculo liso de aorta después de la inducción por la interleuquina-1 (IL-1) o el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un fenómeno que requiere la síntesis de novo de proteínas y está catalizado por la enzima NO sintasa que es independiente del calcio y la calmodulina (FLEMING y col., 1991; BEASLY col., 1991; SCHINI y col., 1991).

La infusión intravenosa de análogos de la L-arginina produce un incremento de

la presión sanguínea arterial sistémica y un incremento de la resistencia vascular de la circulación cerebral y coronaria (REES y col., 1989b; GARDINER y col., 1990; HUMPHRIES y col., 1991). Los incrementos de la resistencia vascular coronaria también se observan después de la infusión directa del análogo, nitro-L-arginina en el conejo (AMEZCUA y col., 1989), perro (CHU y col., 1991) y en la cabra (GARCIA y col., 1992). En segmentos aislados de arterias coronarias grandes y pequeñas del cerdo, la inhibición de la sintasa del NO causa un incremento en el tono basal en presencia pero no en ausencia del endotelio, y esta respuesta se revierte con L-arginina, mientras que la D-arginina no tiene efecto (RICHARD y col., 1990; TSCHUDI y col., 1991). Estos resultados sugieren que existe una liberación basal de EDRF que controla el tono vascular coronario bajo condiciones normales (KELM y SCHRADER, 1990), pero que también tiene un papel en la fase inicial de la vasodilatación observada en la condición de hipoxia (PARK y col., 1992).

Los análogos de la L-arginina como L-NMMA y L-NAME (inhibidores de la síntesis de NO), también inhibieron la respuesta vasodilatadora a la ACh infundida en la circulación coronaria (AMEZCUA y col., 1988, 1989; CHU y col., 1991; GARCIA y col., 1992), mientras que in vitro la respuesta para la ACh está inhibida en arterias coronarias grandes y pequeñas del perro (MYERS y col., 1989). Por otro lado, la retirada mecánica del endotelio no parece influir en la contracción para la ACh en arterias coronarias grandes porcinas (GRÄSER y col., 1986; BÉNY y col., 1986), a pesar de que la incubación con LNNA incrementa la respuesta para ACh en arterias coronarias grandes porcinas, si bien el último efecto se puede atribuir

a la inhibición de la liberación basal de EDRF (TSCHUDI y col., 1991). TSCHUDI y col. (1991) observaron lo mismo en arterias coronarias pequeñas del cerdo y varios estudios han sugerido que no existen receptores muscarínicos endoteliales en arterias coronarias porcinas, que medien la liberación de EDRF, dado que la ACh no relajó arterias precontraídas (NAKAYAMA y col., 1988; KAWAMURA y col., 1989; TSCHUDI y co., 1991). De lo descrito anteriormente, se puede deducir que se necesita más información para clarificar el papel del endotelio en la respuesta contráctil de la ACh en la circulación coronaria.

HIPERPOLARIZACION DEL MUSCULO LISO VASCULAR Y DE LA CAPA CELULAR ENDOTELIAL

Antes de que se descubriera el factor relajante derivado del endotelio, se sabía que la ACh podía inducir hiperpolarización de la arteria coronaria del cobaya (KITAMURA y KURIYAMA, 1979) y de las arterias mesentéricas (KURIYAMA y SUZUKI, 1978). Estos autores sugirieron que el mecanismo de esta hiperpolarización se debía al incremento de la conductancia de potasio, dado que la ACh a una concentración de $0.1\mu\text{M}$ causó hiperpolarización del potencial de membrana entre -44 y -67 mV en las arterias coronarias del cobaya, mientras que el potencial de equilibrio de sodio y potasio fueron positivos comparados con el potencial de reposo (KITAMURA y KURIYAMA, 1979). Por otro lado, estos autores no pudieron explicar la observación de que la ACh aparentemente estuviera generando una contracción al mismo tiempo que causaba hiperpolarización, mientras que la presencia de una concentración externa en

exceso de potasio produjo contracción con o sin despolarización. Sin embargo, después de la demostración de que las relajaciones de la ACh dependen del endotelio (FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980), se ha demostrado en segmentos arteriales de diferentes lechos vasculares que la hiperpolarización inducida por la ACh depende de la presencia del endotelio (CHEN y col., 1988; FELETOU y VANHOUTTE, 1988; CHEN y SUZUKI, 1990). En vasos desprovistos de endotelio es posible restablecer la hiperpolarización con una solución de ACh que anteriormente ha pasado por un segmento con el endotelio intacto (FELETOU y VANHOUTTE, 1988; CHEN y col., 1991). Esto sugiere que la hiperpolarización está causada por un factor presente en la solución de perfusión en lugar de una conexión directa entre el endotelio y el músculo liso.

Estudios en la arteria cerebral media de conejo han sugerido que la hiperpolarización dependiente del endotelio probablemente abre canales de potasio dependientes de ATP, ya que la hiperpolarización se revierte con glibenclamida (STRANDEN y col., 1989; BRAYDEN, 1990). Por otro lado, estudios en la arteria mesentérica de rata y arterias coronarias de cobaya han sugerido que la hiperpolarización inducida por la ACh y la relajación de estos vasos no estaba afectada por la glibenclamida, pero era inhibida por tetraetilamonio, sugiriendo una activación de un canal de potasio activado por calcio (MCPHERSON y ANGUS, 1991; CHEN y col., 1991; ECKMAN y col., 1992). De este modo, la liberación inducida por la ACh de distintos factores hiperpolarizantes derivados del endotelio o EDRF, puede estar involucrada en las acciones de la ACh en distintos vasos, o el efecto a nivel del músculo liso vascular puede estar mediado por mecanismos

diferentes. Las propiedades del EDRF y del EDHF se distinguen por las siguientes características electrofisiológicas y farmacológicas:

(1) Las respuestas mecánicas al EDRF son sostenidas, mientras que las respuestas al EDHF son transitorias (KOMORI y SUZUKI, 1987 a,b; CHEN y col., 1988; FELETOU y VANHOUTTE, 1988; CHEN y SUZUKI, 1989; RAND y GARLAND, 1992).

(2) El EDRF relaja el músculo liso con un incremento de la producción de GMPc (HOLZMAN y col., 1982; IGNARRO y KADOWITZ, 1985), y el azul de metileno y la hemoglobina inhiben las acciones del EDRF y la acumulación de GMPc (MARTIN y col., 1985). Estos tratamientos no afectan la hiperpolarización inducida por la ACh (CHEN y col., 1988; HUANG y col., 1988).

(3) El candidato a EDRF, NO, relaja algunas preparaciones arteriales sin cambiar el potencial de membrana, mientras que la ACh causa hiperpolarización en las mismas arterias (KOMORI y col., 1988). Además, en arterias coronarias caninas, la hiperpolarización inducida por la ACh fue abolida por ouabaina mientras que se mantuvo la relajación (FELETOU y VANHOUTTE, 1988).

(4) El EDRF se libera continuamente en ausencia de estímulos, mientras que el EDHF solo se libera después de la estimulación con un agonista (CHEN y SUZUKI, 1989).

(5) En la arteria safena del conejo, se ha sugerido que el EDRF y el EDHF son liberados por la ACh a través de la activación de dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos (KOMORI y SUZUKI, 1987 a,b). De este modo, la atropina fue más potente que la pirenzepina en inhibir la relajación de la ACh, mientras que las dos sustancias fueron equipotentes en inhibir la hiperpolarización

inducida por la ACh, sugiriendo que la hiperpolarización se activa a través de receptores M_1 y la relajación sostenida a través de receptores M_2 (KOMORI y SUZUKI, 1987 a,b). Sin embargo, en arterias coronarias de cobaya no fue posible distinguir la hiperpolarización y la relajación inducida por la ACh con el uso de pirenzepina, dando así lugar a evidencias en contra de la existencia de dos poblaciones de receptores muscarínicos en el endotelio que selectivamente induzcan la liberación de uno u otro factor (KEEF y BOWEN, 1989). Además, la separación del EDRF y EDHF se ha complicado con la demostración de que el NO puede causar una hiperpolarización de las arterias uterinas (TARE y col., 1990). Sin embargo, recientemente, se ha observado que la hiperpolarización inducida por el NO y la ACh está mediada por diferentes mecanismos en arterias mesentéricas pequeñas de rata (GARLAND y MCPHERSON, 1992). En las arterias coronarias de cobaya, la ACh todavía relaja las preparaciones hasta un 70% del máximo, después de que los niveles de GMPc fueron reducidos con L-NMMA o hemoglobina a concentraciones no detectables (KEEF y col., 1993). Estos resultados sugirieron que la ACh no sólo libera NO para incrementar los niveles de GMPc en el tejido, sino que también relaja a través de un segundo mecanismo independiente del GMPc, probablemente involucrando al factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).

En resumen, el EDHF es un factor no-prostanoide probablemente diferente del EDRF. El EDRF y el EDHF pueden ser el mismo compuesto en un estado diferente o tener características comunes en otros lechos vasculares. El EDHF hiperpolariza y relaja el músculo liso coronario a través de la apertura de canales

de potasio activados por calcio sin incrementos en la concentración de GMPc.

En la arteria carótida de conejo, donde la ACh genera una hiperpolarización transitoria seguida de una sostenida, la reducción del calcio extracelular inhibe la hiperpolarización sostenida y reduce el componente transitorio (BUSSE y col., 1988; CHEN y SUZUKI, 1990). Igualmente, se observó que el componente sostenido de la hiperpolarización dependía del influjo de calcio extracelular a través de canales sensibles al níquel (entrada de calcio inducida por un agonista), mientras que las bloqueantes de los canales de calcio voltaje- dependientes, nifedipina y verapamil, no tenían efectos sobre la respuesta inducida por la ACh en el endotelio de aorta de rata (MARCHENKO y SAGE, 1993). La hiperpolarización mantenida provocada por la ACh y medida en el endotelio de arterias coronarias intactas de cobaya, también depende del calcio y en contraste con el endotelio de aorta de rata, los bloqueantes de los canales de potasio, tetraetilamonio, charybdotoxina y 4-aminopyridina (4 AP) causaron despolarización del endotelio y bloquearon la hiperpolarización provocada por la ACh en esta preparación (CHEN y CHEUNG, 1992). Esto sugiere la existencia de diferencias entre especies y entre distintos lechos vasculares.

La proteína quinasa C no parece estar involucrada en la hiperpolarización de las células endoteliales inducida por la ACh, ya que los antagonistas estaurosporina y H-7 no alteraron la respuesta para este agonista (MARCHENKO y SAGE, 1993). Se ha demostrado que el ionóforo del calcio, A23187, es capaz de hiperpolarizar las células endoteliales de la arteria carótida de conejo y arterias coronarias

caninas, en presencia pero no en ausencia del calcio extracelular (CHEN y SUZUKI, 1990; ILLIANO y col., 1992). Tanto la cafeína que facilita y la procaína que inhibe la liberación de calcio de las reservas intracelulares, bloquearon la hiperpolarización sostenida inducida por la ACh en la arteria carótida del conejo (CHEN y SUZUKI, 1990). Además, el antagonista de la calmodulina, calmidazolium, inhibió las relajaciones dependientes del endotelio y resistentes a la nitro-L-arginina en la arteria coronaria canina, y las inducidas por la bradiquinina y el A23187. Estos resultados sugieren que el incremento de calcio citoplasmático, al igual que ocurría con el EDRF, es un paso importante en la producción de EDHF y el complejo calcio-calmodulina tiene un papel importante en la regulación de la síntesis y liberación del factor (ILLIANO y col., 1992; NAGAO y col., 1992).

En resumen, la liberación de EDHF de las células endoteliales depende del incremento intracelular de las concentraciones de calcio $[Ca^{2+}]_i$ mediante la entrada de calcio a través de canales sensibles al níquel y la liberación de calcio de las reservas intracelulares. Alternativamente, los receptores muscarínicos activados por la ACh están acoplados a la hidrólisis del lípido derivado de la membrana, PIP₂ a DAG e IP₃ por la fosfolipasa C. El segundo mensajero, IP₃, conduce a la liberación de calcio de las reservas intracelulares y causa así un incremento de $[Ca^{2+}]_i$. El último podría activar los canales de potasio dependientes del calcio.

FACTORES CONTRACTILES DERIVADOS DEL ENDOTELIO

La evidencia a favor de un papel para sustancias vasoconstrictoras derivadas del endotelio (EDCF) fue obtenida a raíz de la observación de que las respuestas contráctiles para la ACh y otros agonistas eran disminuidas con la retirada mecánica del endotelio, y las siguientes observaciones que se exponen a continuación indicaron que no se podía atribuir a un daño del músculo liso vascular (DEMEY y VANHOUTTE, 1982; GREENBERG y TANAKA, 1982; LÜSCHER y VANHOUTTE, 1986): (1) La sensibilidad del músculo liso no fue alterada, ya que no había cambios en la concentración de agonista que induce el 50% de la respuesta máxima. (2) La respuesta contráctil para otros agonistas era incrementada en las mismas preparaciones. (3) En algunas preparaciones vasculares no se observó una depresión de la respuesta máxima con la retirada del endotelio.

Los factores contráctiles se liberan del endotelio en respuesta al estiramiento (KATUSIC y col., 1987), distensión (RUBANYI y VANHOUTTE, 1986), anoxia y agonistas como trombina, serotonina y ACh (ALTIERE y col., 1986; KATUSIC y col., 1988; FURCHGOTT y VANHOUTTE, 1989). El acoplamiento estimulación-secreción en las células endoteliales parece ser calcio-dependiente, como indica la liberación inducida con el ionóforo de calcio, A23187 (KATUSIC y col., 1988).

Se han identificado por lo menos tres diferentes EDCF que pueden ser liberados del endotelio:

(1) EDCF₁, está liberado por estiramiento o estimulación con ACh o A23187 y

depende de la vía de la ciclooxigenasa. El efecto del EDCF_1 es bloqueado con indometacina e inhibidores de la sintetasa de tromboxano (KATUSIC y col., 1988), pero también con secuestradores de los aniones superóxido como la dismutasa del superóxido. El último se genera durante el metabolismo del ácido araquidónico y junto con el tromboxano A_2 puede inducir los efectos que se atribuyen al EDCF_1 (FURCHGOTT y VANHOUTTE, 1989).

(2) El EDCF_2 es un polipéptido sintetizado por las células endoteliales, sensible a la destrucción por la tripsina e induce contracciones de arterias y venas (HICKEY y col. 1985; GILLESPIE y col., 1986; O'BRIEN y col., 1987). El polipéptido ha sido identificado como endotelina (YANAGISAWA y col., 1988) y forma parte de una familia de péptidos (endotelina-1, endotelina-2 y endotelina-3) (INOVE y col., 1989). La endotelina-1 tiene un efecto vasoconstrictor lento, potente y de larga duración en la circulación coronaria humana (FRANCO-CERECEDA, 1989; DASHWOOD y col., 1991, CHESTER y col., 1992; GODFRAIND, 1993), probablemente activando receptores del subtipo ET_A en las partes distales de la circulación coronaria y activando los dos subtipos en las arterias proximales (GODFRAIND, 1993). Sin embargo, la información sobre la liberación y función del EDCF_2 bajo circunstancias normales es escasa. El "shear stress" suprime la expresión del gen de endotelina y como la contracción de las endotelinas es lenta y de larga duración se podría sugerir que el péptido corrige situaciones con flujo reducido.

(3) El EDCF_3 es una sustancia diferente del EDCF_1 y del EDCF_2 y es liberado en arterias caninas, incluyendo la circulación coronaria, en la situación de anoxia provocando una contracción inmediata y dependiente del endotelio (RUBANYI y

PAUL, 1986; RUBANYI y VANHOUTTE, 1986).

Parece ser que el EDCF₁ es el único factor que puede mediar parte de las respuestas para la ACh, mientras que la endotelina y el EDCF₃ probablemente solo interfieran con la regulación colinérgica con un papel modulador, aunque no se ha investigado en arterias intramiocárdicas.

2. OBJETIVOS

Una vasoconstricción inapropiada en las arterias coronarias de resistencia podría tener un papel fisiopatológico importante en enfermedades con un flujo sanguíneo coronario reducido (isquemia cardiaca). Se ha sugerido que el sistema nervioso autónomo y en especial, el control parasimpático, tiene una influencia bajo estas circunstancias, pero todavía es controvertido si la circulación coronaria recibe una inervación colinérgica, no conociéndose además los receptores implicados en las respuestas para la ACh en la circulación coronaria bajo condiciones fisiológicas normales.

En el presente trabajo, los experimentos se han llevado a cabo aislando arterias coronarias de pequeño calibre de la zona de la pared ventricular anterior, a 3-4 cm del apex del corazón, zona que es afectada con mayor frecuencia por la isquemia coronaria y el infarto de miocardio. Con el objeto de conocer la respuesta de las arterias coronarias de resistencia a la ACh en condiciones normales, se han utilizado animales jóvenes donde el riesgo de enfermedad isquémica es menor. Las arterias han sido examinadas con una técnica microvascular in vitro que permite conocer el diámetro interno de los segmentos y medir la fuerza isométrica bajo circunstancias óptimas, sin influencia de factores metabólicos o de la presión extravascular del miocardio. Por último, mediante técnicas bioquímicas e histoquímicas se ha investigado la presencia de fuentes para la ACh.

Los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1) Determinar si los enzimas necesarios para la síntesis y metabolización de la

ACh están presentes en la circulación coronaria del cordero y comprobar si juegan un papel en la respuesta a la ACh exógena.

2) Con el uso de antagonistas preferenciales, caracterizar los receptores que median la respuesta contráctil a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero.

3) Estudiar la función del endotelio en la respuesta a la ACh en las arterias coronarias de resistencia de cordero.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Material biológico, reactivos y soluciones

Material biológico

En el presente trabajo se han utilizado arterias coronarias de diferentes tipos de animales. Las arterias ovinas fueron obtenidas de animales sacrificados diariamente en el Matadero Municipal de Madrid. Una vez extraídos los corazones se trasladaron al laboratorio en una solución de Krebs-Henseleit modificada, a 4°C. En estudios comparativos utilizando arterias de rata, los animales fueron obtenidos del animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y luego desangrados antes de extraer el corazón o las arterias intestinales. Las arterias coronarias humanas fueron obtenidas de corazones de pacientes sometidos a trasplantes en el British National Heart and Lung Institute (Harefield, Inglaterra).

Aparatos utilizados.

- * Polígrafo Grass, modelo 79D de la Grass Medical Instrument con cuatro canales intercambiables y contador de tiempo.
- * Transductor isométrico Grass, modelo FT 03 C.
- * Termostato de inmersión B. Braun, modelo Thermomix 1420.
- * Baños de órganos aislados de tipo Högestatt de 5 ml de capacidad (figura 3a) (HÖGESTATT, 1983).
- * Polígrafo Houston de dos canales.
- * Miógrafos microvasculares dobles de 10 ml de capacidad con temperatura regulada y con dos transductores, permitiendo montar y examinar dos

segmentos vasculares al mismo tiempo (Figura 3b) (MULVANY y HALPERN, 1977).

- * Generador de impulsos Cibertec (modelo CS20) con salida de corriente constante.
- * Osciloscopio Gould (Modelo OS255).
- * pHmetro CRISON (Modelo digit 501).
- * Balanza SARTORIUS.
- * Ultracentrífuga Beckman.
- * Contador de centelleo Beckman.
- * Microtomo de congelación (LEITZ).
- * Microscopio Diaplan (LEITZ) con sistema de cámara fotográfica, marca Wild, modelo MPS12.

Reactivos

Los productos empleados en estos experimentos fueron:

- * A23187, ionoforo de calcio (Sigma).
- * Acetilcoenzima A (Sigma).
- * [¹⁴C]-acetilcoenzima A (New England Nuclear).
- * Acetilcolina HCl (Sigma).
- * Acido nordihidroguaiaretico (NDGA, Sigma).
- * AF-DX116(11-[2[(dietilamino)metil]-1-piperidinil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido [2,3-b] [1,4] benzodiazepin-6-ona) (Bohringer Ingelheim, Dr. Karl Thomae).
- * Albúmina sérica bovina (Sigma).

- * L-arginina (Sigma).
- * Atropina, sulfato de (Merck).
- * Carbacol, cloruro de carbamil colina (Sigma).
- * Cloruro de colina (Sigma).
- * 4-DAMP (4-difenil-acetoxi-Nmetilpiperidena) metilioduro. Cortesía del Dr. Barlow, (Bristol, G.B.).
- * EDTA (Acido etilendiaminetetraacético disodico, Merck).
- * EGTA (Acido etilenglicol-bis (β -aminoetil ester) N, N, N', N'-tetraacético, Merck).
- * Fentolamina, chlorhidrato de (Sigma).
- * Fisostigmina (Eserina Sulfato, Sigma).
- * Formaldehido (35-40%) (Pancreac).
- * HHSiD (hexahydrosiladifenidol-hydrochloride). Cortesía del Dr. Barlow (Bristol, G.B.).
- * Hemoglobina (Sigma)
- * Hexametonio, bromuro de (SERVA).
- * ISO-OMPA (tetraisopropilpirofosforamide) (Sigma).
- * McN-A-343 (4-hidroxi-2-butinil-1-trimetilamonio m-clorocarbimilato cloruro) (Sigma).
- * Metacolina, cloruro de β -carbamil colina (Sigma).
- * NADPH (Sigma)
- * Neostigmina (Prostigmina, Roche)
- * N^G-nitro-L-arginina (LNNA, Sigma).
- * Nicotina (SERVA).

- * Nitrito sódico (NaNO_2) (Probus, Barcelona).
- * Nitroblue tetrazolium (Sigma).
- * DL-noradrenalina, chlorhidrato (Sigma).
- * Oxotremorina M (Sigma).
- * pFHHSiD (para-fluoro-hexahydrosiladifenidol hydrochloride) (RBI).
- * Paraformaldehido (Merck).
- * Pirenzepina, chlorhidrato (Dr. Karl Thomae).
- * Poli-lisina (Sigma).
- * Papaverina (Sigma).
- * DL-Propranolol, chlorhidrato (Sigma).
- * Sacarosa (Merck).
- * Telencepina (RBI).
- * U46619 (Sigma).

Todas las soluciones se prepararon inicialmente como soluciones madre a una concentración de 10^{-1} - 10^{-2} M y se almacenaron a -20°C ; a partir de éstas se realizaban diariamente las correspondientes diluciones. Las soluciones concentradas se realizaron en agua destilada excepto las siguientes: A23187, que se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10^{-3} M; AF-DX 116, que se preparó en una solución ligeramente ácida (0,05N de HCl), las catecolaminas en agua destilada con ácido ascórbico 10^{-3} M para prevenir la oxidación del grupo catecol, y el U46619 se preparó en etanol al 96%.

Los experimentos con las sustancias fotosensibles (A23187 y papaverina) se

prepararon y utilizaron limitando la entrada de luz en el laboratorio.

Soluciones

La composición de la solución salina fisiológica (**PSS**) modificada de Krebs-Henseleit y expresada en concentración milimolar (mmol/l) fue la siguiente:

* Bicarbonato sódico (HCO_3Na)	24.9
* Cloruro cálcico (Cl_2Ca)	1.5
* Cloruro magnésico (Cl_2Mg)	1.2
* Cloruro potásico (ClK)	4.6
* Cloruro sódico (ClNa)	119
* Fosfato monopótasio (KH_2PO_4)	1.2
* Na_2EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)	0.027
* Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	11

Estos reactivos fueron de máxima pureza procedentes de los laboratorios Merck.

La solución de PSS se preparó diariamente y la adición de Na_2EDTA se hizo con el fin de retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano. La solución fue oxigenada con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2), dando un pH final de 7,4.

La solución salina fisiológica rica en potasio (**KPSS**) se preparó sustituyendo en una solución PSS normal, cantidades equimolares de NaCl por KCl dando una solución isotónica.

Las soluciones salinas fisiológicas carentes de calcio se prepararon omitiendo el Cl_2Ca y el Na_2EDTA , PSS_0 , o añadiendo Na_2EGTA 0.1 mM como quelante de Ca^{2+} , $\text{PSS}_{0.1}$.

En el estudio histoquímico se utilizaron las siguientes soluciones tampón, todas ellas para el procesado del tejido a nivel de microscopio óptico.

Para la preparación del tampón fosfato 0.2 M, pH=7.4, previamente se prepararon las siguientes soluciones:

(1) Solución de fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$) 0.2 M:

* Fosfato disódico 71.6 g.

* H_2O destilada 1 l.

(2) Solución de fosfato monosódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$) 0.2 M:

* Fosfato monosódico 27.6 g.

* H_2O destilada 1 l.

Para la preparación del tampón fosfato 0.2 M, pH=7.4 se mezclaron 8 volúmenes de la solución (1) y 2 volúmenes de la solución (2) y se ajustó el pH.

El tampón fosfato 0.1 M, pH = 7.2 se preparó a partir del tampón fosfato 0.2 M, pH = 7.4 añadiendo por cada volumen de esta solución el mismo volumen de H_2O destilada y luego se ajustó el pH.

Para la preparación del tampón NaOH - Maleato 0.1 M, pH=6.0, previamente

se prepararon las siguientes soluciones:

(1) Solución de hidróxido sódico (NaOH) 0.1 M:

- * NaOH 1 g.
- * H₂O destilada 250 ml.

(2) Solución de maleato 0.1 M:

- * Acido maléico 3 g.
- * H₂O destilada 250 ml.

Para la preparación del tampón NaOH - Maleato 0.1 M, pH = 6 se mezclaron 250 ml de la solución (1) y 150 ml de la solución (2). Finalmente, se complementó hasta un volumen final de 1 l con H₂O destilada.

El tampón fosfato salino (PBS) 0.01 M, pH = 7.2 se preparó de la siguiente forma: * Tampón de fosfato 0.2 M, pH = 7.4

- * Cloruro sódico (NaCl) 17.4 g.
- * Cloruro de potasio (KCl) 0.4 g.
- * H₂O destilada hasta 1 l de solución final.

3.2 Metodología de los estudios funcionales

Corazones de corderos de 3-6 meses fueron obtenidos en el Matadero Municipal y sumergidos en un termo hermético, que contenía solución PSS previamente aireada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) a una temperatura de 4°C para reducir el metabolismo cardiaco, siendo transportado al laboratorio en un tiempo aproximado de 30 minutos.

Disección y preparación de la arteria coronaria izquierda descendente (LDA)

En el laboratorio, se eliminó primero el pericardio y la pared anterior del corazón fue extraída y limpiada varias veces con PSS, antes de situarla en una placa de Petri, con solución PSS aireada con carbógeno donde se procedió a disecar la arteria coronaria izquierda descendente (LDA).

Los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente fueron montados como anillos sobre dos ganchos metálicos en baños de órganos aislados (Fig. VA) del tipo Högestatt (HÖGESTATT y ANDERSON, 1983) de 5 ml de capacidad con la temperatura regulada a 37°C y aireados con carbógeno. Uno de los dos ganchos metálicos se conectaba a un transductor isométrico GRASS (FTo3C) para captar las variaciones de tensión de la preparación, las cuales eran amplificadas y registradas en un polígrafo GRASS (modelo 79D). El otro gancho metálico se encontraba unido a una unidad de desplazamiento, la cual podía ser manipulada mediante un tornillo micrométrico, permitiendo un ajuste preciso de la tensión, pero no el control del circunferencia de la preparación. Durante un período de estabilización se equilibraba la tensión basal de las preparaciones a 7.5 N/m aproximadamente, ya que experimentos previos mostraron la tensión pasiva aplicada como la más adecuada para las preparaciones, ya que permitía obtener las máximas respuestas con una alta reproductibilidad.

La solución del baño era renovada cada 10-15 minutos, mediante succión.

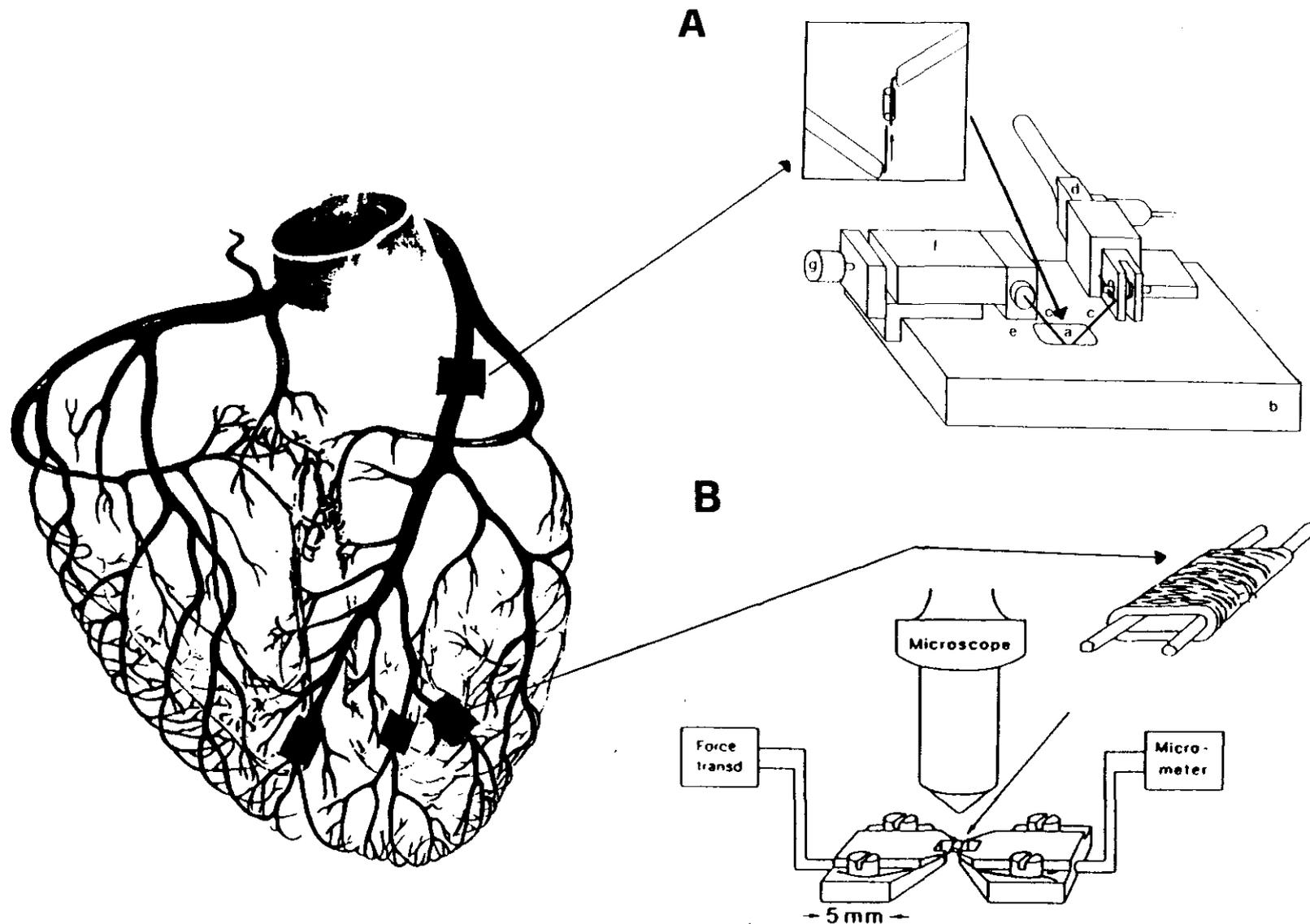


Figura V. Esquema donde se muestran los lugares de disección de los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente y las arterias coronarias de resistencia, así como el montaje de las preparaciones en un baño de Högestatt (A) y en un miógrafo microvascular de Mulvany y Halpern (B), respectivamente.

Después de ser equilibrados, la contractilidad de los segmentos fue examinada activando el anillo dos veces con KPSS. Todas las respuestas para la ACh fueron realizados en PSS normal. En primer lugar, se obtuvo una curva control concentración-respuesta para la ACh incrementando la concentración de la sustancia en el baño en medias unidades logarítmicas. Las preparaciones fueron lavadas cambiando la solución del baño varias veces y se dejaron los vasos equilibrar durante 2 horas antes de ser incubados con los diversos tratamientos durante 30 min y de repetir la curva concentración-respuesta para la ACh. Al final del experimento, se determinó la presencia o ausencia del endotelio mediante una precontractión con una mezcla de U46619 (10^{-7} M) y serotonina (10^{-6} M) y cuando la contracción se estabilizó, se añadió el ionóforo de calcio, A23187, a una concentración de 3×10^{-6} M. Las relajaciones mayores del 50% fueron consideradas como evidencia de la integridad de las células endoteliales.

Microdissección y montaje de las arterias coronarias de resistencia

Después de disecar el pericardio, se realizó un corte 5-6 centímetros sobre el apex del corazón y se extrajo una pieza de la pared del ventrículo izquierdo con una rama diagonal de la arteria coronaria izquierda descendente. Ramas intramiocárdicas de tercer a cuarto orden de la arteria coronaria izquierda descendente, localizadas cerca del apex del ventrículo izquierdo, fueron disecadas usando material de microdissección normalmente utilizado en operaciones de cirugía

oftálmica por el procedimiento anteriormente descrito (SIMONSEN y col., 1992). Se disecó en primer lugar el miocardio que cubre la terminación de la rama diagonal de la arteria coronaria izquierda siguiendo el recorrido de ésta y sus ramificaciones, y posteriormente el miocardio adyacente de la rama intramiocárdica de tercer a cuarto orden que se quiere disecar. Se cortó un segmento de aproximadamente 2 mm de longitud, y un alambre de 40 μm fue introducido en la luz de la arteria. Después se liberó el segmento del miocardio subyacente adherido a la arteria y fue trasladado al baño del miógrafo microvascular. Segmentos arteriales de 2 mm de longitud fueron montados como preparaciones en anillo en dos alambres de 40 μm en un miógrafo isométrico doble (**Fig. VB**), fijando uno de los alambres a un transductor de fuerza isométrico y el otro a un tornillo micrométrico (MULVANY y NYBORG, 1980).

Normalización de las arterias de resistencia

Las arterias fueron equilibradas en PSS, 37°C, pH 7,4, durante 30 min. Se determinó la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso, y a partir de aquí, la circunferencia interna L_{100} correspondiente a una presión transmural de 100 mmHg para un vaso relajado in situ (MULVANY y HALPERN, 1977; MULVANY y WARSHAW, 1979). Las arterias fueron colocadas a una circunferencia interna L_1 , siendo $L_1 = 0.9 \times L_{100}$, circunferencia a la cuál el desarrollo de fuerza es máximo. El diámetro luminal interno efectivo fue determinado como $l_1 = L_1 / \pi$.

Retirada mecánica del endotelio vascular

En los segmentos de la arteria coronaria izquierda descendente, las células endoteliales fueron retiradas mecánicamente siguiendo el procedimiento descrito por FURCHGOTT y ZAWADZKI (1980). Antes de montar el segmento, se pasó una pinza por la luz del segmento, friccionando ligeramente la íntima.

En las arterias coronarias de resistencia, el endotelio también fue retirado mecánicamente. En una serie de experimentos, las células endoteliales fueron retiradas con el segmento todavía adherido al miocardio, pasando un cabello humano por la luz del segmento y luego friccionando durante 5 minutos la parte interna. En otra serie de experimentos, siguiendo el procedimiento descrito por NYBORG (1990) el endotelio se retiró con el segmento ya montado en el miógrafo. Primero se redujo la tensión pasiva del vaso, se introdujo un alambre de 40 μm o un cabello humano en la luz vascular y se friccionó suavemente la superficie endotelial sin dañar el músculo liso vascular. Posteriormente, los vasos se dejaron equilibrar durante 15 minutos antes de aplicar la tensión pasiva nuevamente. En el miógrafo microvascular, se aprovechó el hecho de que se pueden montar dos segmentos en el mismo baño para montar en un transductor un vaso con el endotelio intacto y en el otro, un vaso sin endotelio. La confirmación de la retirada del endotelio se evaluó con una prueba funcional. Las arterias fueron contraídas con ACh o U44619 y se añadió $3 \times 10^{-6} \text{M}$ del ionóforo de calcio, A23187. Una relajación del segmento menor de un 10% para el A23187, fue considerada evidencia de la ausencia funcional de endotelio. En los segmentos de la arteria

coronaria izquierda descendente, la retirada del endotelio fue confirmada morfológicamente usando el método de plata descrito por POOLE y col. (1958), mientras que este método no fue apropiado para evaluar la presencia o ausencia de las células endoteliales en las arterias coronarias de resistencia, debido a dificultades en el manejo de las mismas, ya que al abrirlas longitudinalmente existe el riesgo de retirar la mayoría de las células endoteliales.

Procedimiento experimental de los estudios funcionales

El siguiente procedimiento experimental fue incluido en el protocolo para asegurar la integridad de las arterias coronarias de resistencia: (1) Después de la determinación del diámetro interno, la capacidad contráctil de los vasos se comprobó estimulando los segmentos arteriales con una solución rica en ClK (123.5 mM KPSS), hasta que se registraron respuestas reproducibles. La máxima capacidad contráctil de los vasos fue estimada mediante la activación con 10^{-5} M ACh en KPSS. (2) El tono miogénico de las preparaciones se determinó midiendo la diferencia entre la línea base justo después de la normalización y la línea base obtenida en un medio libre de calcio o tras la aplicación de papaverina (10^{-4} M), como paso final del experimento. (3) La integridad del endotelio se estimó induciendo una contracción estable con ACh o U46619 y añadiendo el ionóforo del calcio, A23187 (3×10^{-6} M) o sustancia P (3×10^{-8} M). Se consideró evidencia de integridad endotelial una relajación mayor del 50%.

Estimulación eléctrica transmural

La estimulación eléctrica transmural de las preparaciones se realizó de acuerdo con el método descrito por ANGUS y col. (1988), mediante dos electrodos de platino colocados en el interior de los cabezas de montaje, en paralelo al segmento vascular en el míografo microvascular y a 1-2 mm de distancia de la preparación. Los electrodos se conectaron a un estimulador, Cibertec (CS20) con salida de corriente constante. El estimulador fue calibrado de tal forma que generase pulsos de onda cuadrada de 0.3 ms, agrupados en trenes de 20 segundos de duración, con una frecuencia de 0.5 a 32 Hz, a intervalos de 3 minutos y con corriente supramáxima que se determinaba para cada preparación al comienzo del experimento. Los parámetros elegidos fueron controlados con el osciloscopio.

Las curvas frecuencia-respuesta se realizaron variando la frecuencia de 0.5 a 32 HZ. A continuación y después de lavar, se esperaron 45 minutos aproximadamente antes de realizar la siguiente curva. Las respuestas contráctiles fueron obtenidas estimulando sobre la línea base mientras las respuestas relajantes provocadas por estimulación transmural se valoraron en preparaciones previamente contraídas con ACh (10^{-6} M) o U46619 (3×10^{-7} M). Debido a que en la mayoría de los estudios de estimulación de las arterias coronarias realizados hasta el momento, no se ha caracterizado una estimulación neurogénica sensible a tetrodotoxina (GANTZOS y col., 1983; KEEF y KREULEN, 1988), los parámetros de la estimulación y las respuestas fueron comparadas con otro lecho vascular en este caso las arterias peneanas de resistencia.

3.3 Valoración bioquímica de la actividad de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT)

La actividad fue determinada en miocardio del ventrículo izquierdo, arteria coronaria izquierda descendente y ramificaciones de tercer a cuarto orden para el ventrículo izquierdo de la arteria coronaria izquierda descendente. La actividad de la enzima también fue determinada en arterias piales de los mismos animales, con el objeto de tener un control positivo (ESTRADA y col., 1988). Después de la disección, los tejidos fueron lavados en tampón fosfato 0.05 M, pH = 7.4, varias veces para eliminar el PSS y en especial, el calcio. Los distintos tejidos fueron homogeneizados mediante sonicación en tampón fosfato, 0.05 M, pH = 7.4 hasta que el contenido quedó homogéneo (10-30 segundos). Una vez homogeneizado, el tejido fue centrifugado en un rotor a 27000 g (15000 rpm) durante 45 minutos y los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la actividad ChAT, lo cual se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por FORNUM (1975) con las modificaciones introducidas por ESTRADA y col. (1988). Una alícuota de 10 μ l de sobrenadante fue añadida a 10 μ l de ensayo que contenía la siguiente mezcla:

* Acetilcoenzima A	3.6 M
* [¹⁴ C]-acetilcoenzima A	0.4 M
* Cloruro sódico (ClNa)	0.6 M
* Tampón de fosfato sódico, pH = 7.4	0.1 M
* Cloruro de colina	16 M
* EDTA	24 M
* Fisostigmina	0.4 M

* Albúmina sérica bovina

50%

La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 45 min., deteniéndose la reacción por la adición de 5 ml de tampón fosfato sódico 0.01 M a pH 7.4. La [¹⁴C]-ACh formada fue extraída con acetonitrilo que contenía tetrafenilborón sódico y la radioactividad de las muestras en líquido de centelleo con base de tolueno fue determinada mediante un contador de centelleo Beckman. La actividad ChAT fue expresada en pmol/min/mg proteína. La cantidad de proteína fue determinada mediante el método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4 Metodología para los estudios histoquímicos

Las muestras fueron recogidas en el Matadero Municipal inmediatamente después del sacrificio del animal. Se limpió inmediatamente el corazón y la pared anterior fue extraída y sumergida en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH=7.4 a 4°C, y así transportada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se disecaron bloques de miocardio incluyendo la bifurcación de la arteria coronaria izquierda o ramificaciones de tercer orden de la arteria coronaria izquierda descendente, como se ha descrito anteriormente. También se utilizaron arterias de tercer a cuarto orden de la arteria coronaria izquierda descendente pero en este caso después de la microdissección.

Tinción de la acetilcolinesterasa (AChE)

Las piezas de tejido fueron fijadas por inmersión en una solución de

paraformaldehído al 4%, durante 5-6 horas a 4°C, teniendo en cuenta que el descenso de la actividad enzimática puede atenuarse disminuyendo la temperatura de los fijadores (BUTCHER, 1983). Después de la fijación, los bloques de miocardio fueron introducidos en una solución de sacarosa al 7% (p/v) en tampón fosfato de 0.1 M, pH=7.1, durante 3 h. y posteriormente se renovó la solución, donde los tejidos permanecieron toda la noche. El tratamiento con sacarosa sirve como crioprotector y conserva la estructura durante el proceso de sección del tejido.

La sección de los bloques de miocardio, previamente congelados con nieve carbónica se realizó con un microtómo de congelación a -20°C, obteniéndose de cada pieza 15-20 cortes transversales con un grosor de 20-30 μm . Las preparaciones se lavaron 3 veces (20 minutos cada vez) en tampón NaOH-Maleato 0.1M, pH=6).

Las secciones y segmentos de arterias pequeñas fueron preincubados en un medio KARNOWSKY-ROOTS para colinesterasas omitiendo el substrato (ioduro de acetiltocolina) de dicho medio, y añadiendo un inhibidor específico de la butirilcolinesterasa, el ISO-IMPA a una concentración de $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Las concentraciones de ISO-OMPA de 10^{-5} y $3 \times 10^{-5} \text{M}$ producen porcentajes de inhibición de la butirilcolinesterasa de 90% y 92%, respectivamente, y solo un 3-5% de inhibición de la acetilcolinesterasa (BAYLISS y TODRICK, 1956). La preincubación de las secciones de tejido se realizó durante 30 minutos a 37°C, con el fin de que se empezase a inhibir la actividad de las colinesterasas inespecíficas,

antes de la incubación con el medio KARNOWSKY-ROOTS con substrato (BUTCHER, 1983).

Tras la preincubación del tejido con este medio, las secciones fueron incubadas en el medio KARNOWSKY-ROOTS (KARNOWSKY y ROOTS, 1964), preparado de la siguiente forma:

* Tampón NaOH-Maleato 0.1 M, pH=6	6.5 ml.
* Citrato sódico 0.1 M	0.5 ml.
* Sulfato de cobre 30 mM	1 ml.
* H ₂ O destilada	1 ml.
* Ferricianuro de potasio 5 mM	1 ml.
* Ioduro de acetiltiocolina	5 mg.

A este medio se le añadió ISO-OMPA en una concentración 5×10^{-5} M. El medio final de incubación tiene un color verdoso claro y es estable durante horas. El pH final de mismo fue cerca de 6, ya que los pH bajos producen menos difusión y una localización más precisa de los productos de reacción.

La incubación se realizó a 37°C en una estufa durante un tiempo variable de 2-3 horas, y la reacción fue controlada a medida que transcurría, observándose un precipitado de color pardo-rojizo ("pardo-HATCHETT") en los lugares donde se desarrolló actividad AChE.

Después de la incubación, los cortes fueron sometidos a 3 lavados en H₂O

destilada de 10 min. y, posteriormente, deshidratados con concentraciones crecientes de etanol y finalmente con xilol y montados con DEPEX en portaobjetos previamente cubiertos con poli-lisina (1:10).

Aparte de este protocolo se realizaron los siguientes controles de especificidad del método:

A) Incubación de las secciones de tejido en el medio KARNOWSKY-ROOTS con el substrato (ioduro de acetiltiocolina) sin ningún tipo de inhibidor. En este caso se manifestarán las actividades acetilcolinesterasa (específica) y butirilcolinesterasa (inespecífica).

B) Adición de BW-284C-51 en una concentración de $3 \times 10^{-5} M$ a los medios de preincubación e incubación. Se inhibe así la actividad específica de la AChE y se manifiesta la actividad de la butirilcolinesterasa sobre el substrato (inespecífica).

C) Adición de fisostigmina a los medios de preincubación e incubación en una concentración de $3 \times 10^{-5} M$. Este compuesto inhibe por completo la actividad de ambas colinesterasas sobre el substrato y, por tanto, no se manifiesta ningún tipo de actividad en el tejido que queda blanco.

D) Incubación de los cortes de tejido en el medio sin substrato y sin inhibidor: el tejido no refleja ninguna actividad colinesterasa y también queda blanco.

Tinción de la NADPH-diaforasa

Las piezas de tejido fueron fijadas por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4%, durante 24 horas a 4°C. Después de la fijación, los bloques de miocardio fueron introducidos en una solución de sacarosa al 30% (p/v) en tampón fosfato 0.1 M, pH=7.4, durante 3 h. y posteriormente se renovó la solución, donde los tejidos permanecieron toda la noche. Los tejidos fueron seccionados como se ha descrito anteriormente.

La técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa se realizó de acuerdo con el método descrito por HOPE y VINCENT (1989). Las secciones fueron incubados en el siguiente medio:

- * Tampón de fosfato 0.1 M, pH = 8.0
- * β -NADPH 1 mM
- * nitroblue tetrazolium 0.5 mM
- * Triton X-100 0.3%

Las secciones fueron incubados durante 30 min a 37°C y protegidas de la luz. Después de la incubación, los cortes fueron sometidos a 3 lavados en H₂O destilada de 10 min. y, posteriormente, deshidratados con concentraciones crecientes de etanol y finalmente con xilol y montados con DEPEX en portaobjetos previamente cubiertos con poli-lisina (1:10). Se observaron precipitados de color azul claro.

Las secciones de tejido o segmentos enteros de arterias de pequeño calibre fueron examinados con microscopio óptico y la densidad del precipitado de ambos

métodos histoquímicos fue evaluado por inspección visual. Finalmente, se hicieron microfotografías representativas con una cámara marca Wild.

3.5 Cálculos y análisis estadístico de los resultados

Las respuestas mecánicas de los vasos se han expresado como tensión activa (ΔT , N/m) de la pared vascular, que es el incremento de la fuerza (ΔF , N) registrada, dividido por dos veces la longitud (a , m) del segmento vascular: $\Delta T = \Delta F/2a$, o como la presión transmural $\Delta P = (2000 \times \Delta T)/(0.9 \times l_{100})$.

La sensibilidad a los agonistas contráctiles se expresa en términos de concentración eficaz 50, CE_{50} , que es la concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo, E_{max} . El pD_2 es el valor del logaritmo negativo de la CE_{50} : $pD_2 = -\log CE_{50}$. La sensibilidad a los agonistas relajantes se expresa en términos de concentración inhibitoria 50, CI_{50} , que es la concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo. La relajación máxima está expresada en porcentaje del tono de precontracción inicialmente inducido. Tanto la CE_{50} como la CI_{50} fueron estimados determinando el ajuste ("fitting") de la respuesta del vaso según la ecuación de HILL:

$$R = R_{max} \times A(M)^n / (A(M)^n + CE_{50}(M)^n)$$

donde R es la respuesta del vaso para la concentración $A(M)$ del agonista, R_{max} es la respuesta máxima del vaso para el agonista y n es un parámetro de ajuste de la curva o "coeficiente de Hill". El ajuste a la ecuación fue realizado con el programa de ordenador comercial GraphPad versión 3.1 (California, U.S.A.). Las diferencias

de estimar la CE_{50} o CI_{50} por interpolación lineal versus ajuste de una curva son insignificantes, pero la ventaja de usar el ajuste no-lineal es la posibilidad de estimar el coeficiente de Hill que puede dar información sobre el carácter de la respuesta del vaso.

El cálculo de la afinidad (pA_2) de los antagonistas muscarínicos se realizó gráficamente de acuerdo con el método de ARUNLAKSHANA y SCHILD (1959), utilizando la ACh como agonista. Este método o representación de SCHILD consiste en representar el logaritmo de $(CR-1)$ frente al logaritmo de la concentración molar del antagonista ($\text{Log}(B)$), donde CR es la relación entre las concentraciones (M) de agonista que producen el mismo efecto en ausencia y en presencia del antagonista. La CR fue determinada para las concentraciones correspondientes al 50% de la máxima respuesta del agonista de la primera curva control en ausencia del antagonista. Así, la CR fue calculada a partir de la relación de la CE_{50} del agonista en ausencia y presencia del antagonista. La nube de puntos obtenidas en la representación de SCHILD fue ajustada a una recta mediante análisis de regresión de acuerdo con el método de los mínimos cuadrados. Se considera que el antagonismo es competitivo cuando la representación de SCHILD origina una línea recta con una pendiente no significativamente diferente de la unidad. En estas condiciones el valor del pA_2 coincide con la intersección de la línea a lo largo del eje de abscisas, y restringiendo la línea a la unidad (KENAKIN 1987), la intersección con la abscisa corresponde al logaritmo negativo de la constante de disociación del antagonista ($pK_B = -\log K_B$), de acuerdo con la expresión (ARUNLAKSHANA y SCHILD, 1959; KENAKIN, 1987):

$$\text{Log (CR-1)} = \text{Log (B)} - \text{Log } K_B.$$

El pA_2 , la pendiente de SCHILD, el ajuste de la pendiente a la unidad y la determinación del pK_B , se realizaron usando el programa de ordenador de TALLARIDA y MURRAY (1988).

Todos los resultados se expresan en valores absolutos o como porcentaje del control, en forma de medias \pm E.S.M. La evaluación estadística de las medias se ha realizado utilizando el test de la t de Student para observaciones pareadas o no-pareadas, siempre y cuando la muestra se ajuste a una distribución normal o Guassiana. El efecto de los distintos agonistas colinérgicos fue analizado mediante el ANOVA y el test de Bonferroni usado a posteriori (WALLENSTEIN y col. 1980). Un nivel de probabilidad por debajo de 5% fue considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Características pasivas, miogénicas y activas de las arterias coronarias de resistencia

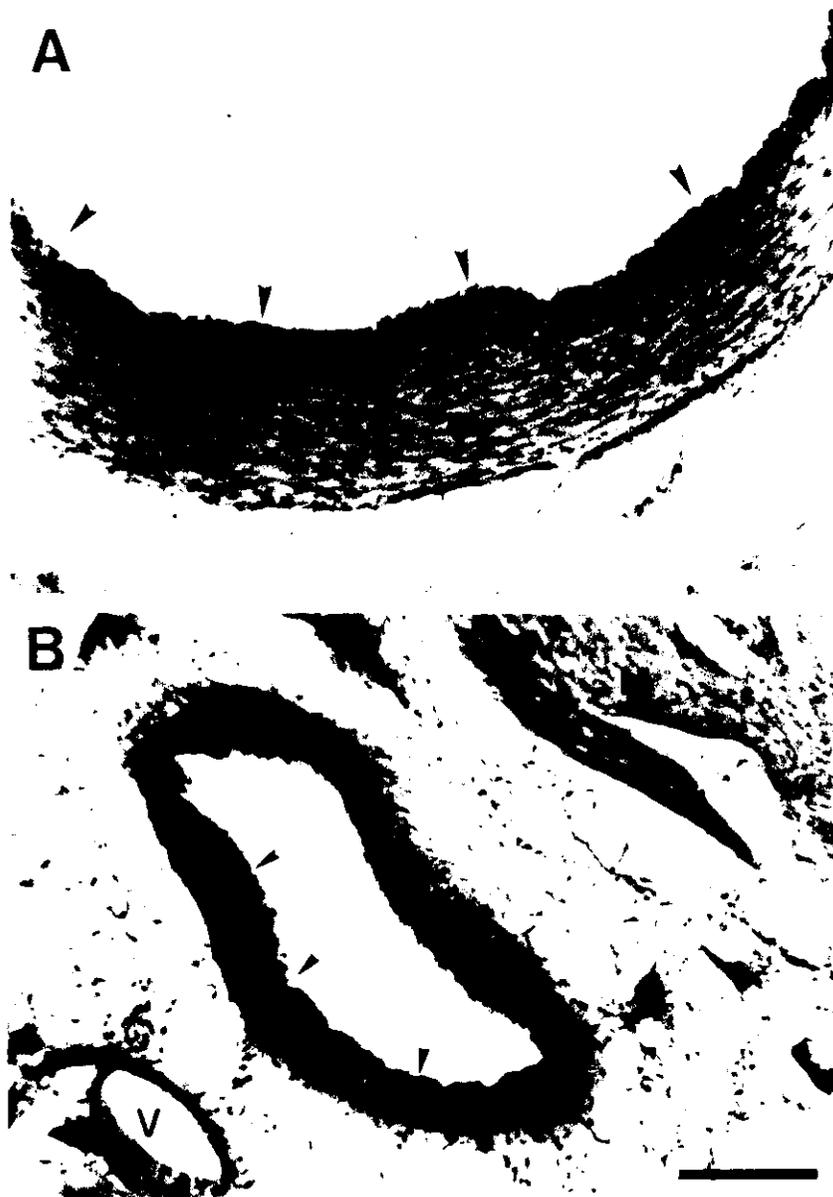
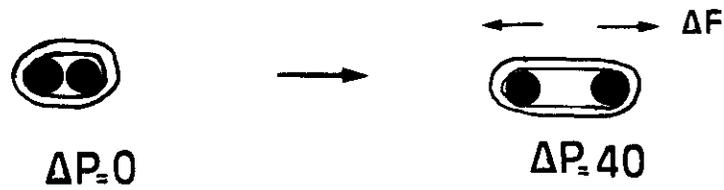
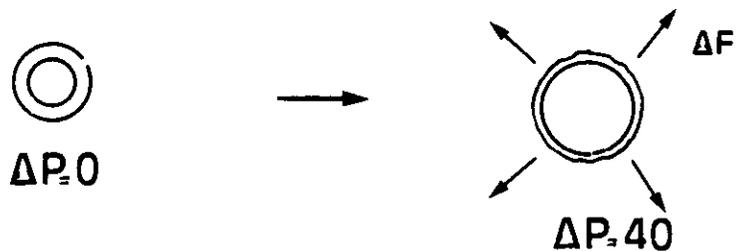


Figura 1. (A) Microfotografía que muestra una sección transversal de la arteria coronaria izquierda descendente (LDA), donde se observa la disposición circular de las fibras de músculo liso. (B) Microfotografía de una sección transversal de una rama de tercer orden de la LDA, donde se observa la misma disposición circular de las fibras de músculo liso. Las flechas indican la localización de la íntima arterial. V, vena. M, miocardio. Barra: 100 μm .

(A) Aplicación de fuerza (ΔF) en un miógrafo microvascular de alambres. ΔP , incremento de presión (mm Hg).



(B) Aplicación de presión en un miógrafo microvascular de presión. ΔP , incremento de presión (mm Hg). ΔF , incremento de fuerza.



(C) Elongación en el plano axial de un segmento microvascular montado en un miógrafo de presión. ΔP , incremento de presión (mm Hg).

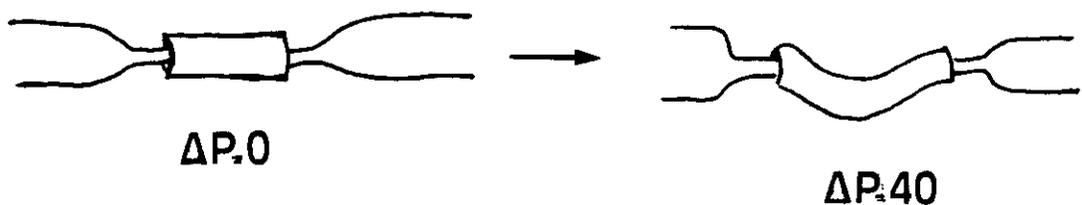


Figura 2. Características comparativas de la morfología de las arterias de resistencia montadas en un miógrafo de alambres (A) y en un miógrafo de presión (B,C).

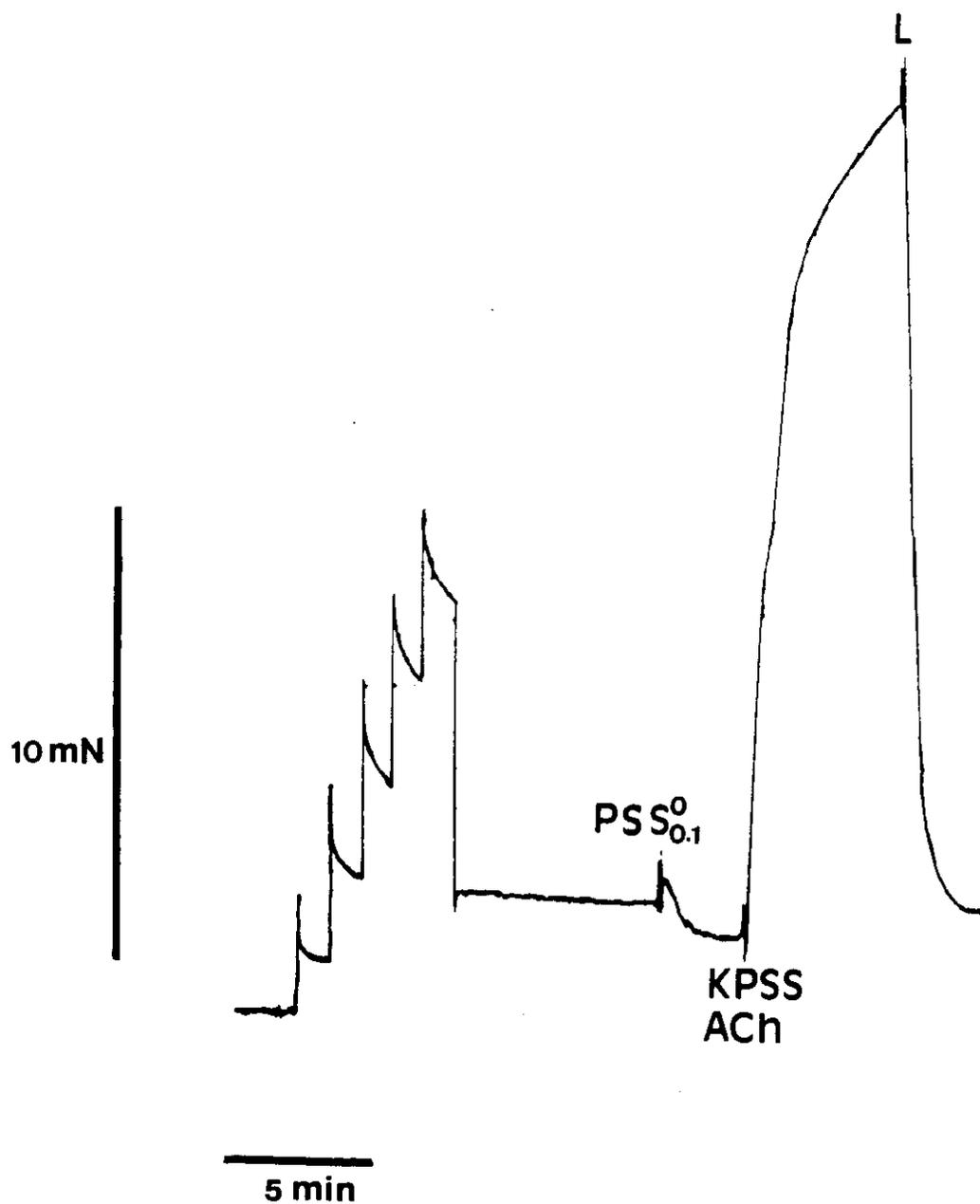


Figura 3. Registro isométrico que muestra la normalización de una arteria coronaria de resistencia de cordero mediante estiramientos sucesivos, la respuesta contráctil a la estimulación con KPSS y ACh (10^{-5}M) y el tono miogénico de la arteria determinado mediante la exposición a una solución libre de calcio con 0.1 mM EGTA. La escala vertical representa la fuerza en mN y la horizontal el tiempo en minutos.

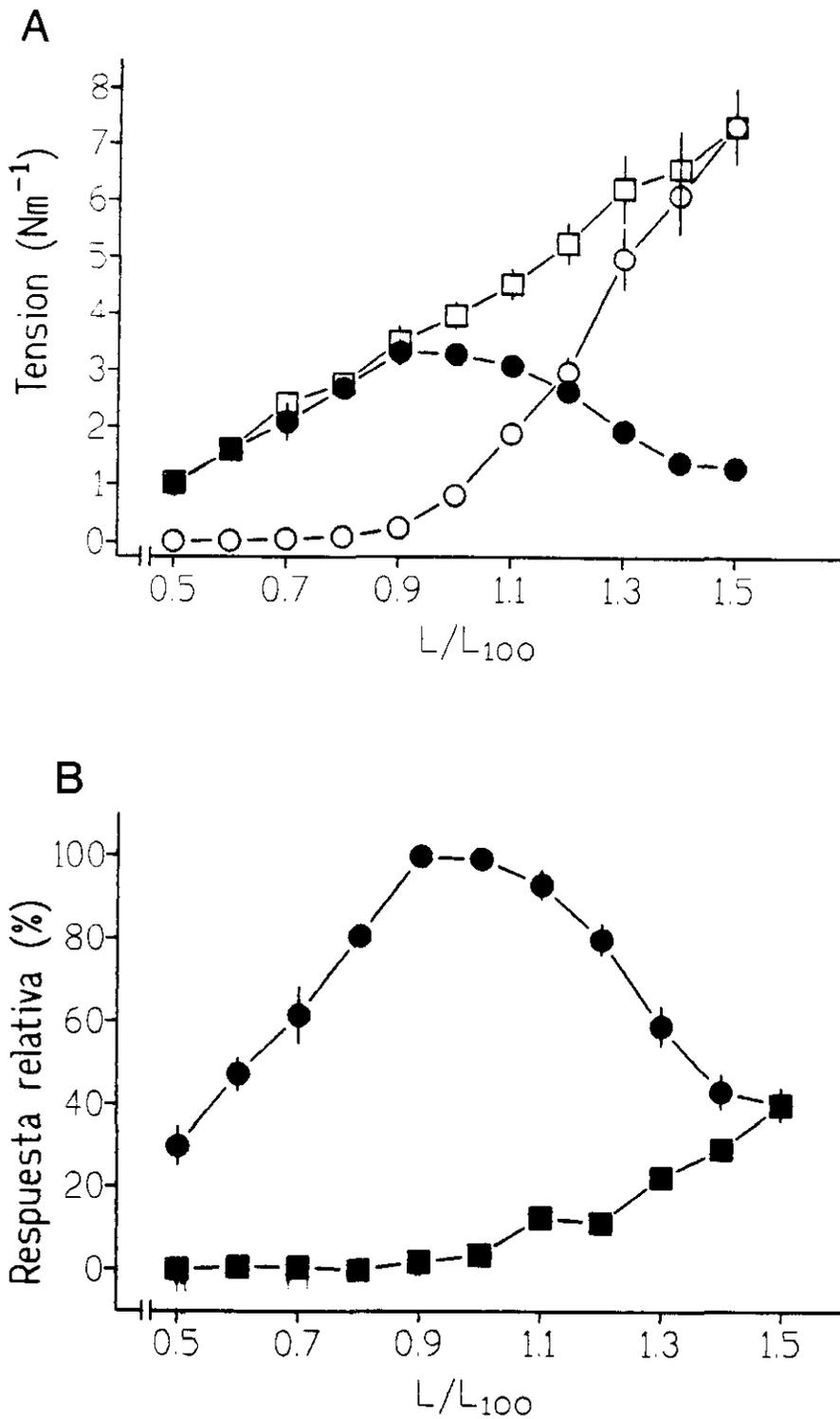


Figura 4. Características pasivas, activas y miogénicas de las arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) Relación entre la circunferencia interna del vaso (L/L_{100}) y la tensión desarrollada (Nm^{-1}). (○) Tensión pasiva (●) Tensión activa (□) Tensión total. (B) Relación entre la circunferencia interna del vaso y la respuesta relativa en porcentaje de la tensión máxima desarrollada. (●) Tensión activa (■) Tono miogénico, determinado como la diferencia en el tono basal en un medio con calcio y en un medio libre de calcio. Los símbolos y las barras representan la media de 4 experimentos y las líneas verticales el E.S.M.

4.2 La respuesta a la acetilcolina

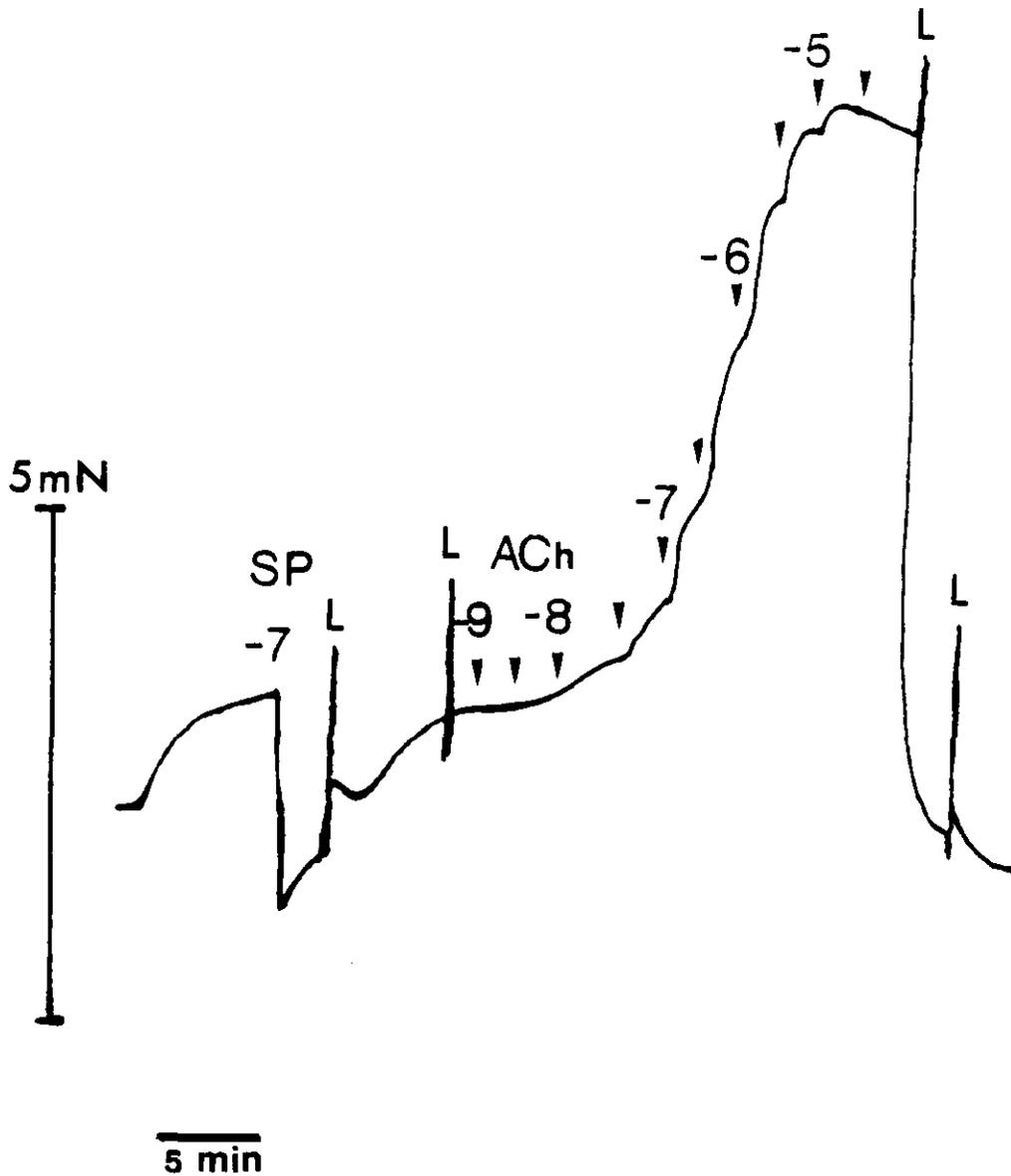


Figura 5. Registro isométrico que muestra la respuesta a concentraciones crecientes de ACh de una arteria coronaria de resistencia de 275 μm , procedente de la aurícula derecha de un paciente de 4 años. La arteria tiene el endotelio intacto, como lo demuestra la relajación a la sustancia P (SP). L: Lavado. La escala vertical muestra la fuerza en mN y la horizontal el tiempo en minutos.

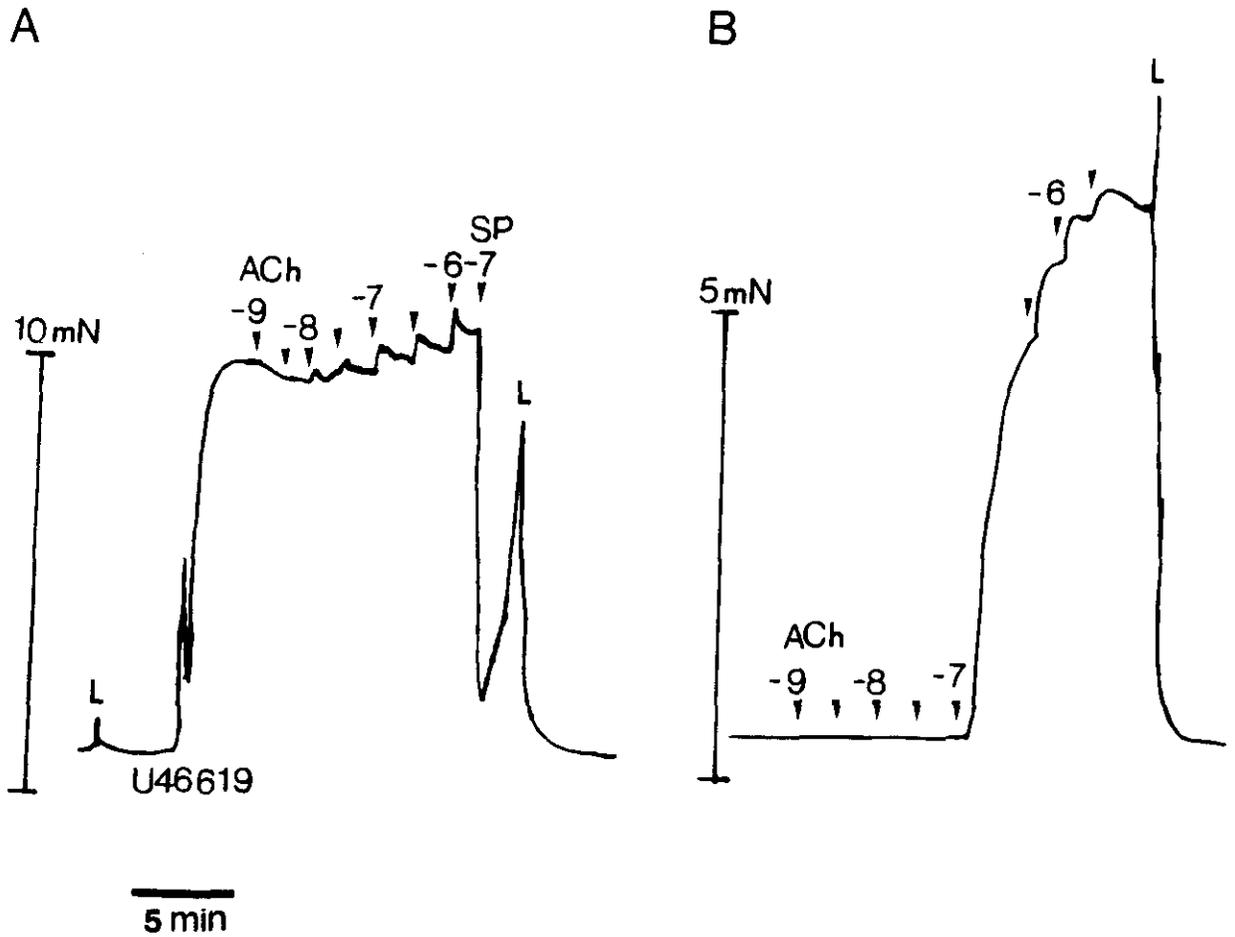


Figura 6. Registros isométricos que muestran (A) la falta de efecto relajante sobre una arteria precontraída con U46619 y (B) el efecto contráctil de concentraciones crecientes de ACh en 2 arterias de resistencia coronarias de 188 μm y 386 μm , respectivamente, procedentes del ventrículo izquierdo de un paciente de 4 años. L: Lavado. La escala vertical muestra la fuerza en mN y la escala horizontal el tiempo en minutos.

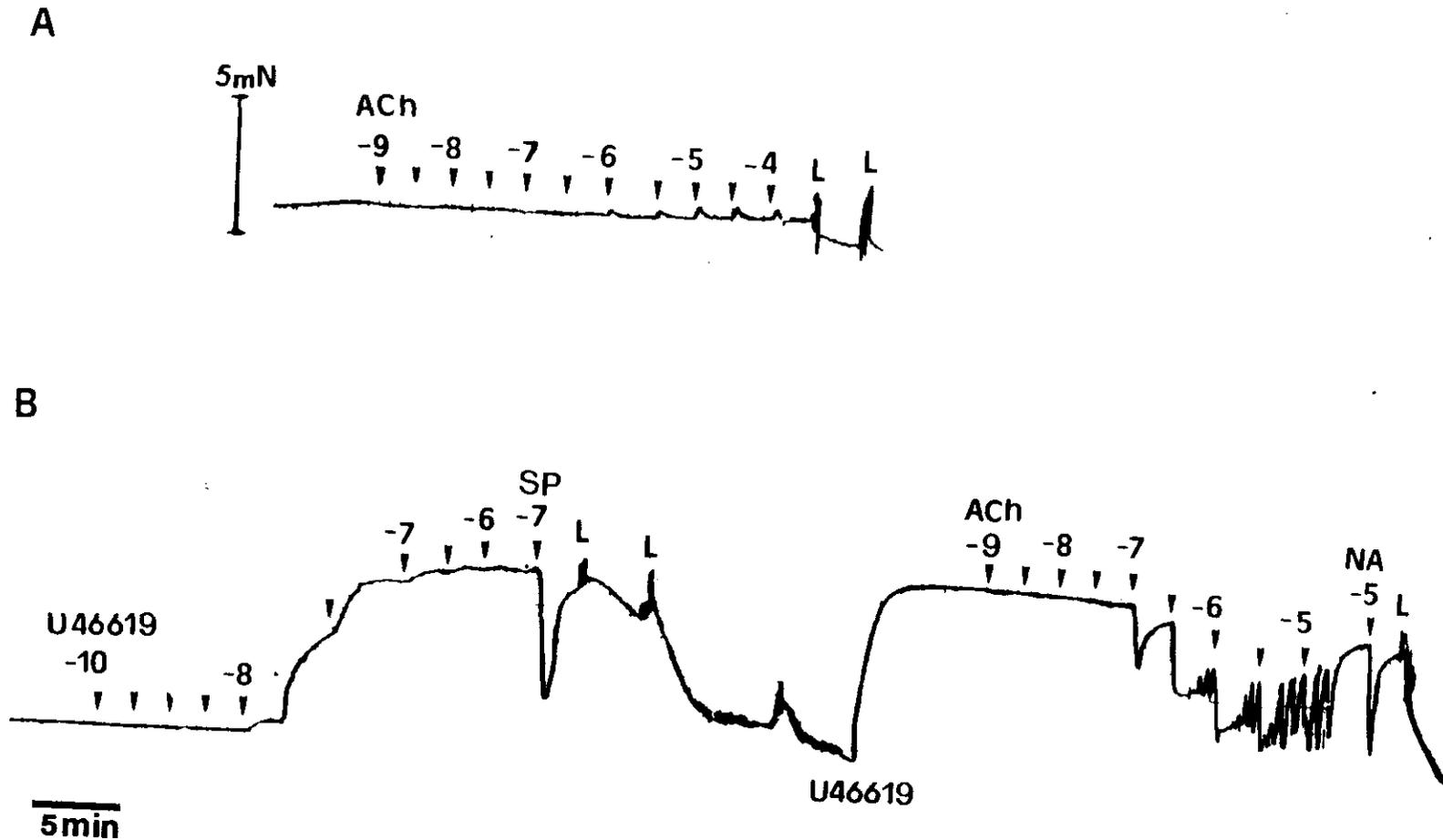


Figura 7. Registros isométricos que muestran (A) la falta de efecto contráctil y (B) el efecto contráctil del análogo del tromboxano U46619 y el efecto relajante de concentraciones crecientes de ACh sobre una precontractión en 2 arterias coronarias de resistencia de 345 μm y 260 μm , respectivamente, procedentes del ventrículo izquierdo de una paciente de 45 años. L: Lavado. La escala vertical muestra la fuerza en mN y la escala horizontal el tiempo en minutos.

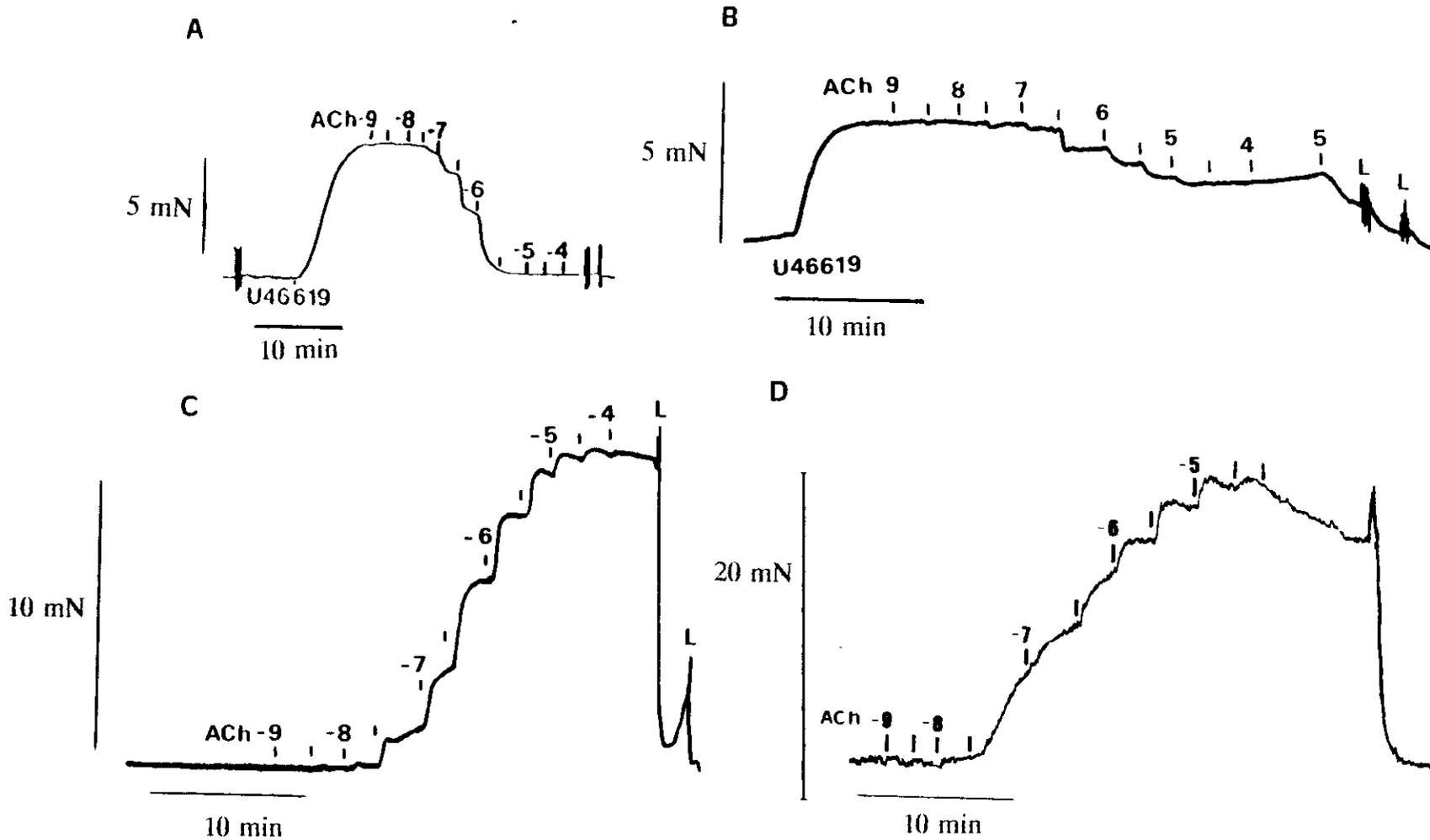


Figura 8. Variabilidad de las respuestas funcionales a la ACh en arterias coronarias de resistencia de diferentes especies. El efecto fue relajante en arterias coronarias de rata (A) y conejo (B) y contráctil en arterias de cordero (C) y cerdo (D). Las escalas verticales muestran la fuerza (mN) y las horizontales el tiempo (minutos).

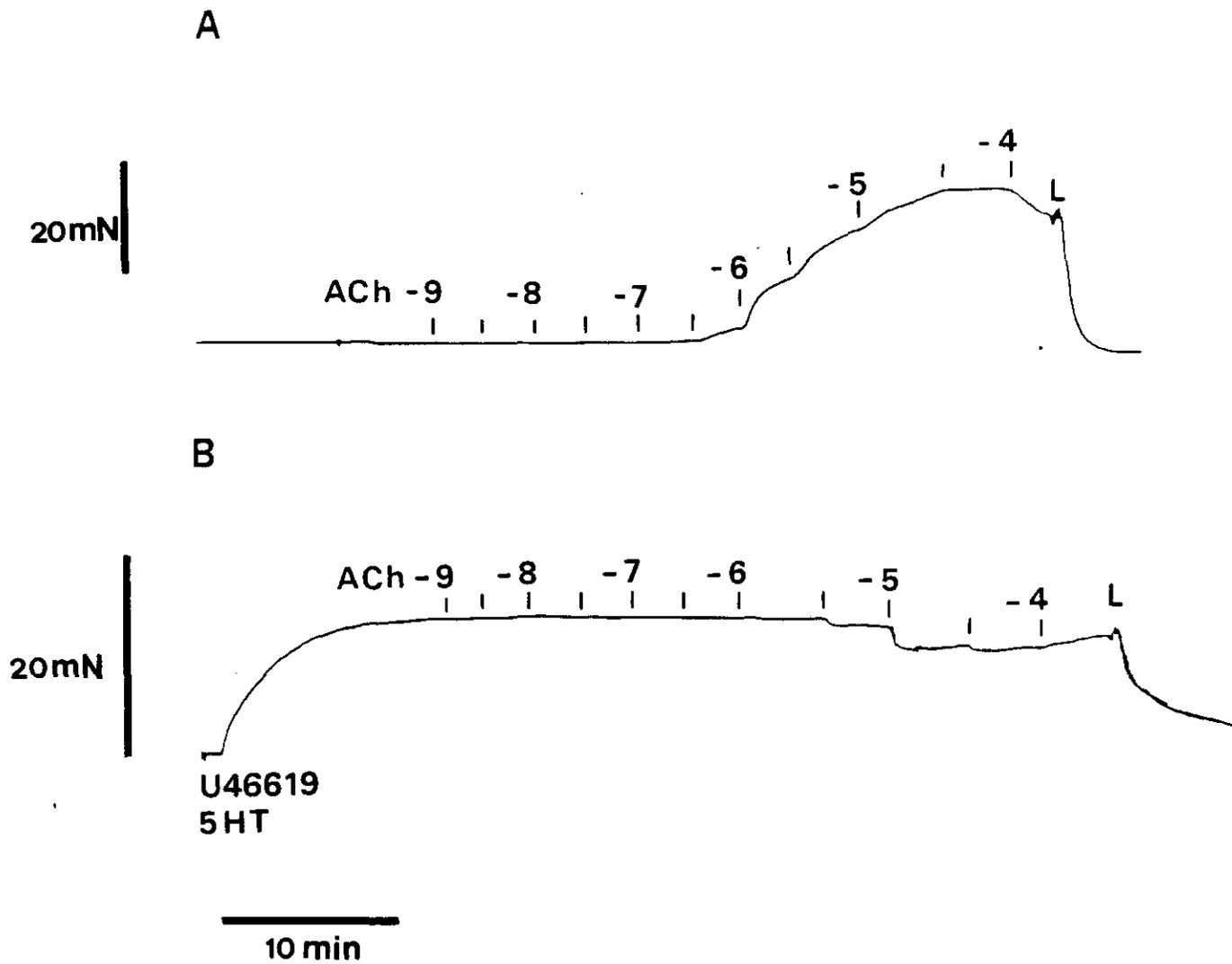


Figura 9. Registros isométricos que muestran el efecto contráctil (A) y el efecto relajante (B) de la ACh en segmentos proximales de la LDA del cordero. L: Lavado. Las escalas verticales indican fuerza (mN) y las horizontales tiempo (minutos).

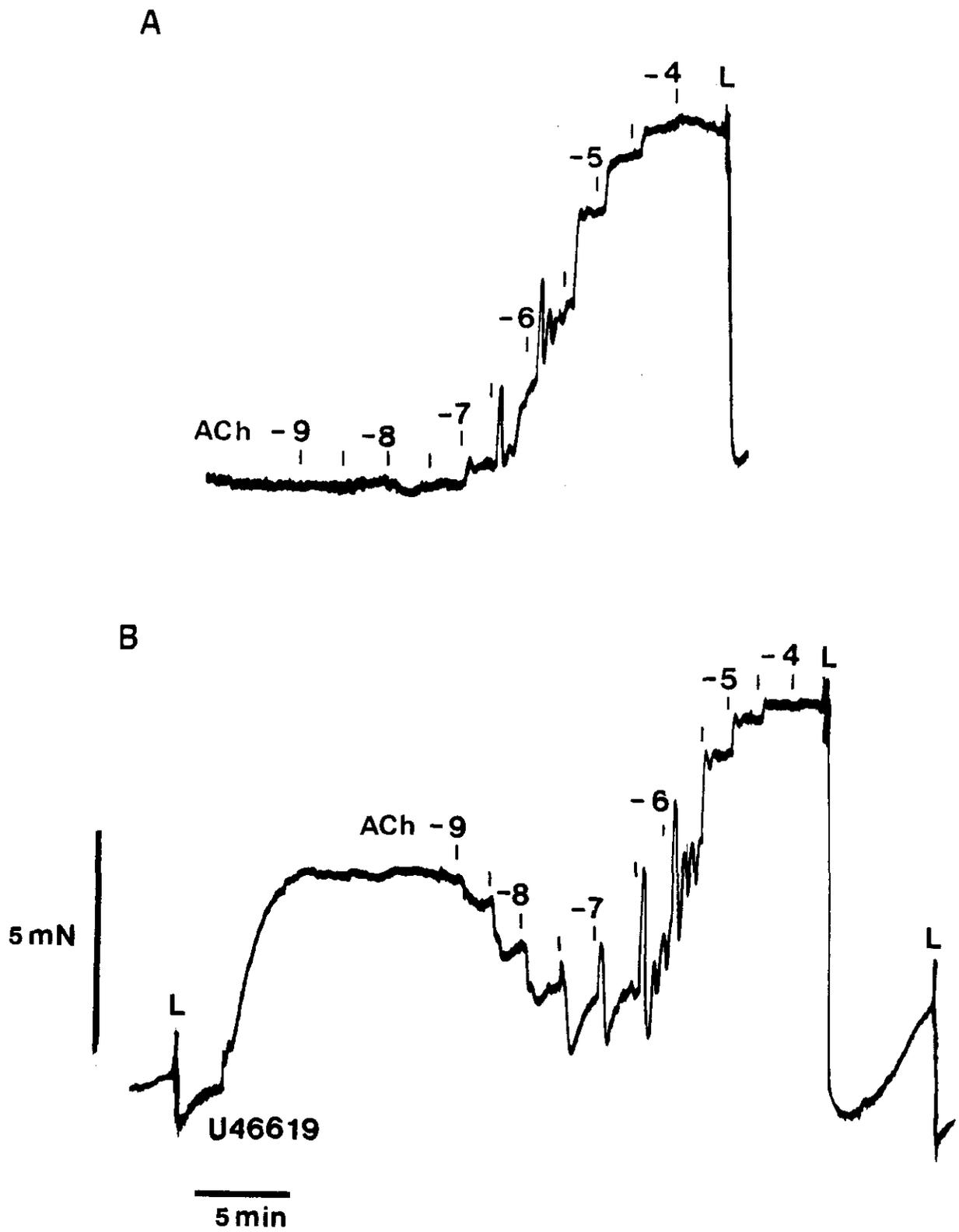


Figura 10. Registros isométricos que muestran el efecto contráctil (A) y el efecto relajante (B) de la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero. L: Lavado. Las escalas verticales indican la fuerza (mN) y las horizontales el tiempo (min).

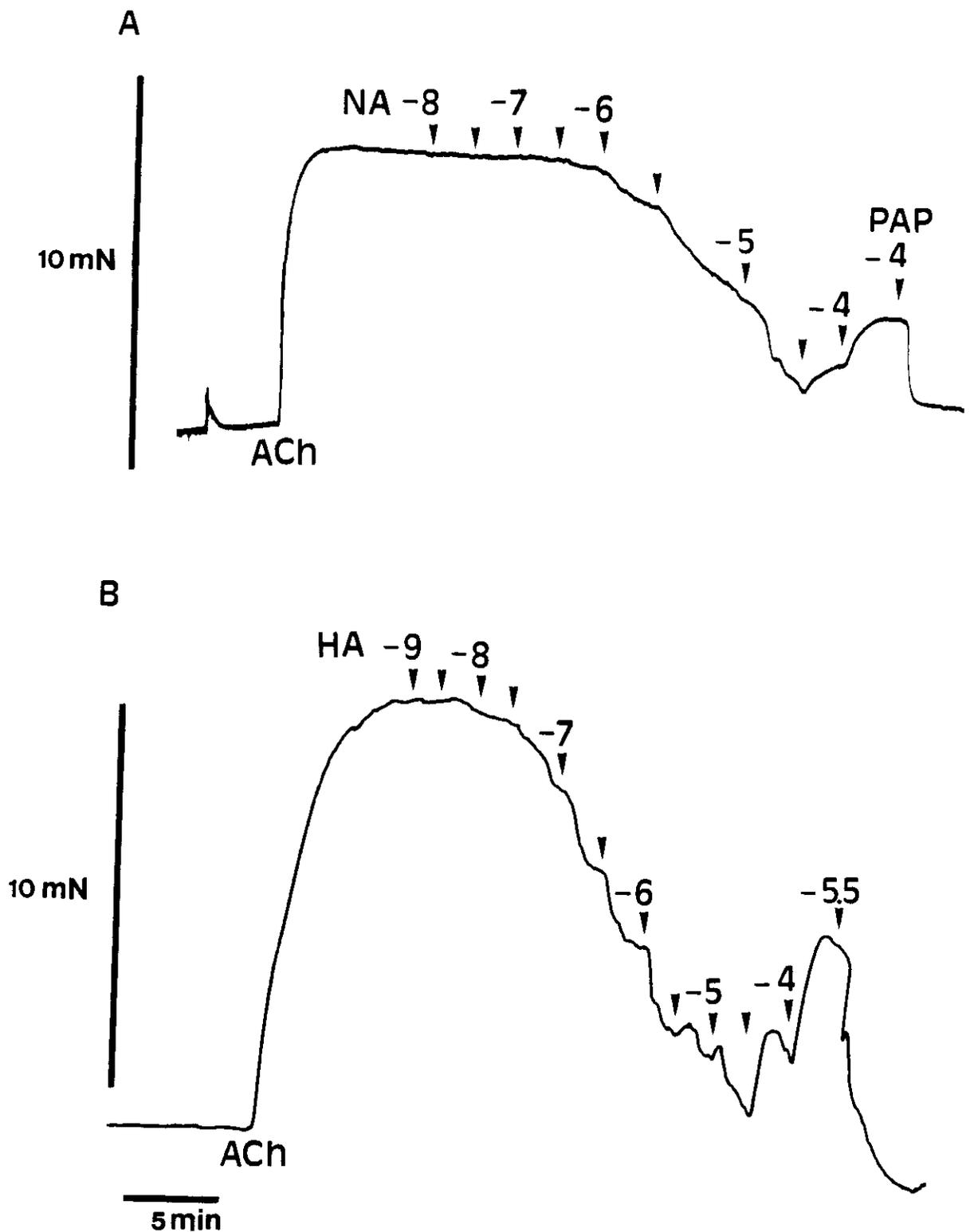


Figura 11. Registros isométricos que muestran los efectos relajantes (A) de la noradrenalina (NA) y (B) histamina (HA) en arterias coronarias de resistencia del cordero, precontraídas con ACh (10^{-6} M). L: Lavado. Las escalas verticales indican fuerza (mN) y las horizontales tiempo (minutos). La relajación total se obtuvo con papaverina (PAP, 10^{-4} M).

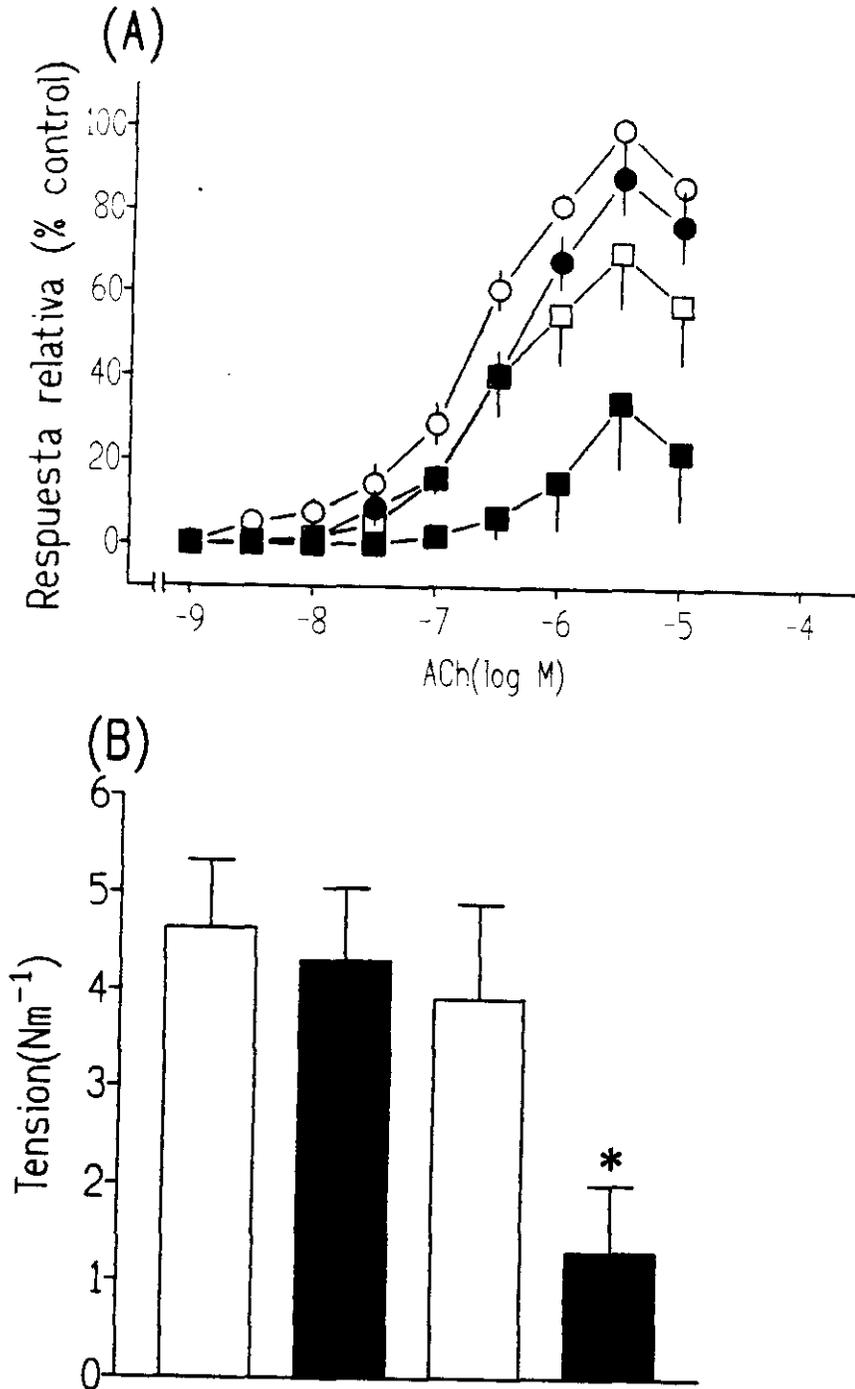


Figura 12. Reproducibilidad de las respuestas a la ACh en segmentos proximales de la LDA del cordero. (A) Curvas concentración-respuesta consecutivas a la ACh (○) 1^{ra} exposición (●) 2^a exposición (□) 3^a exposición (■) 4^a exposición. (B) Valores medios de la respuesta contráctil máxima a la ACh en 4 estimulaciones consecutivas. Los símbolos y las barras representan la media de 6 experimentos y las líneas verticales el E.S.M. * P < 0.05.

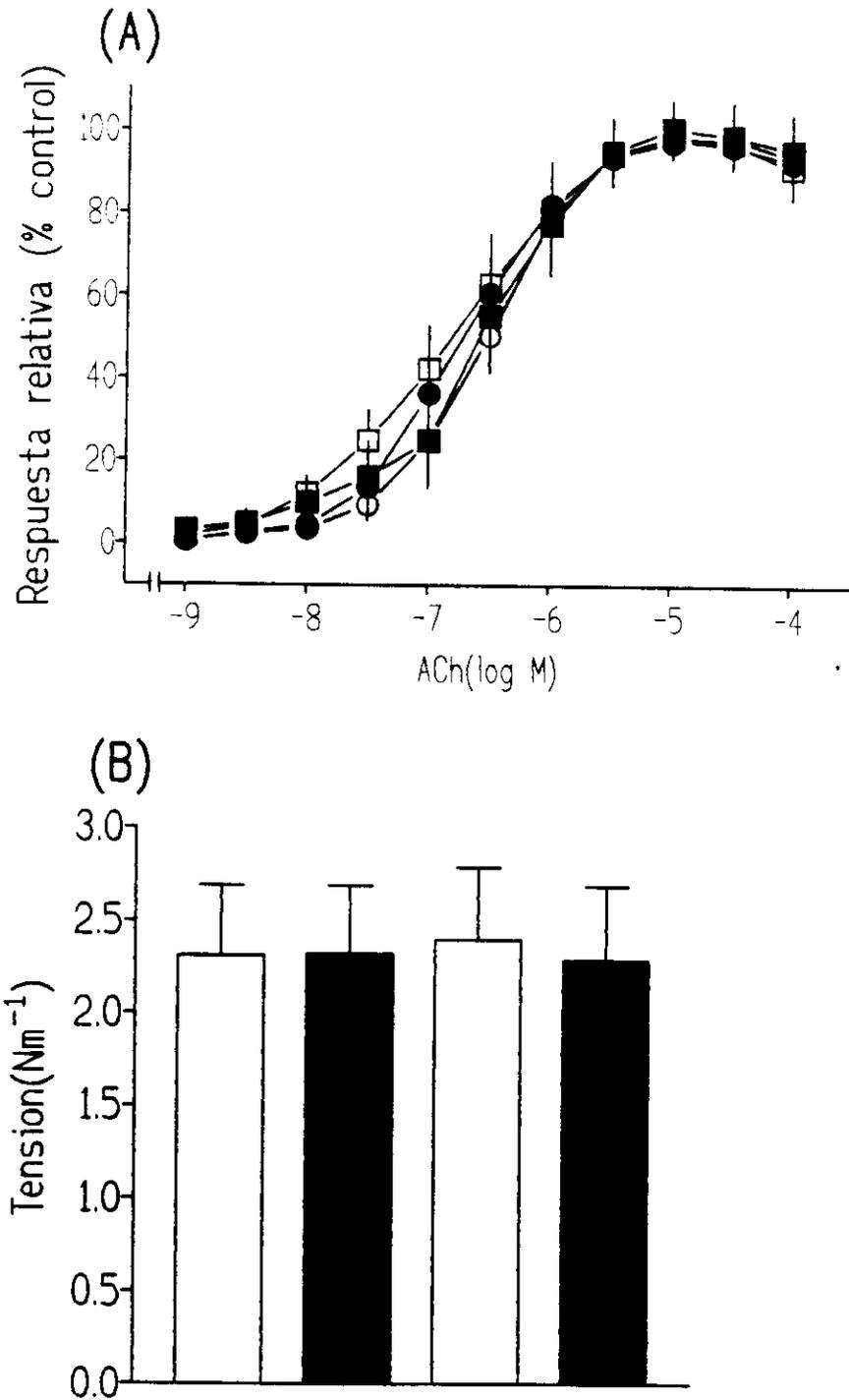


Figura 13. Reproducibilidad de las respuestas a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) Curvas concentración-respuesta consecutivas a la ACh. (○) 1^{ra} exposición (●) 2^a exposición (□) 3^a exposición (■) 4^a exposición. (B) Valores medios de la respuesta contráctil máxima a la ACh en 4 estimulaciones consecutivas. Los símbolos y las barras representan la media de 6 experimentos y las líneas verticales el E.S.M.

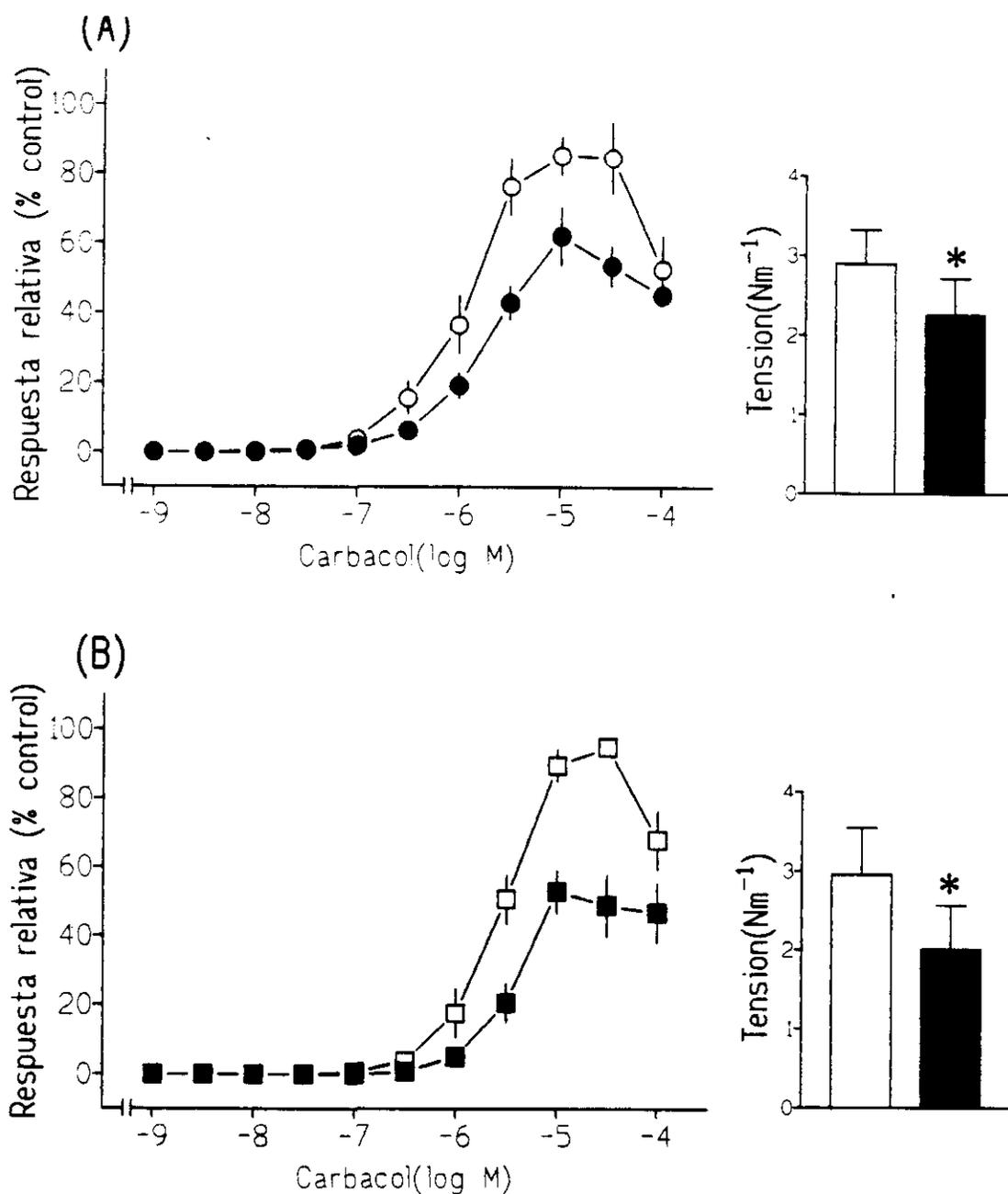


Figura 14. Reproducibilidad de las respuestas al carbachol en segmentos proximales de la LDA del cordero (A) con y (B) sin endotelio. Curvas concentración-respuesta consecutivas al carbachol. (○) 1ª exposición (●) 2ª exposición. Las barras muestran los valores medios de la respuesta contráctil máxima al carbachol en 2 estimulaciones consecutivas. Los símbolos y las barras indican la media de 7 experimentos y las líneas verticales el E.S.M. *P < 0.05

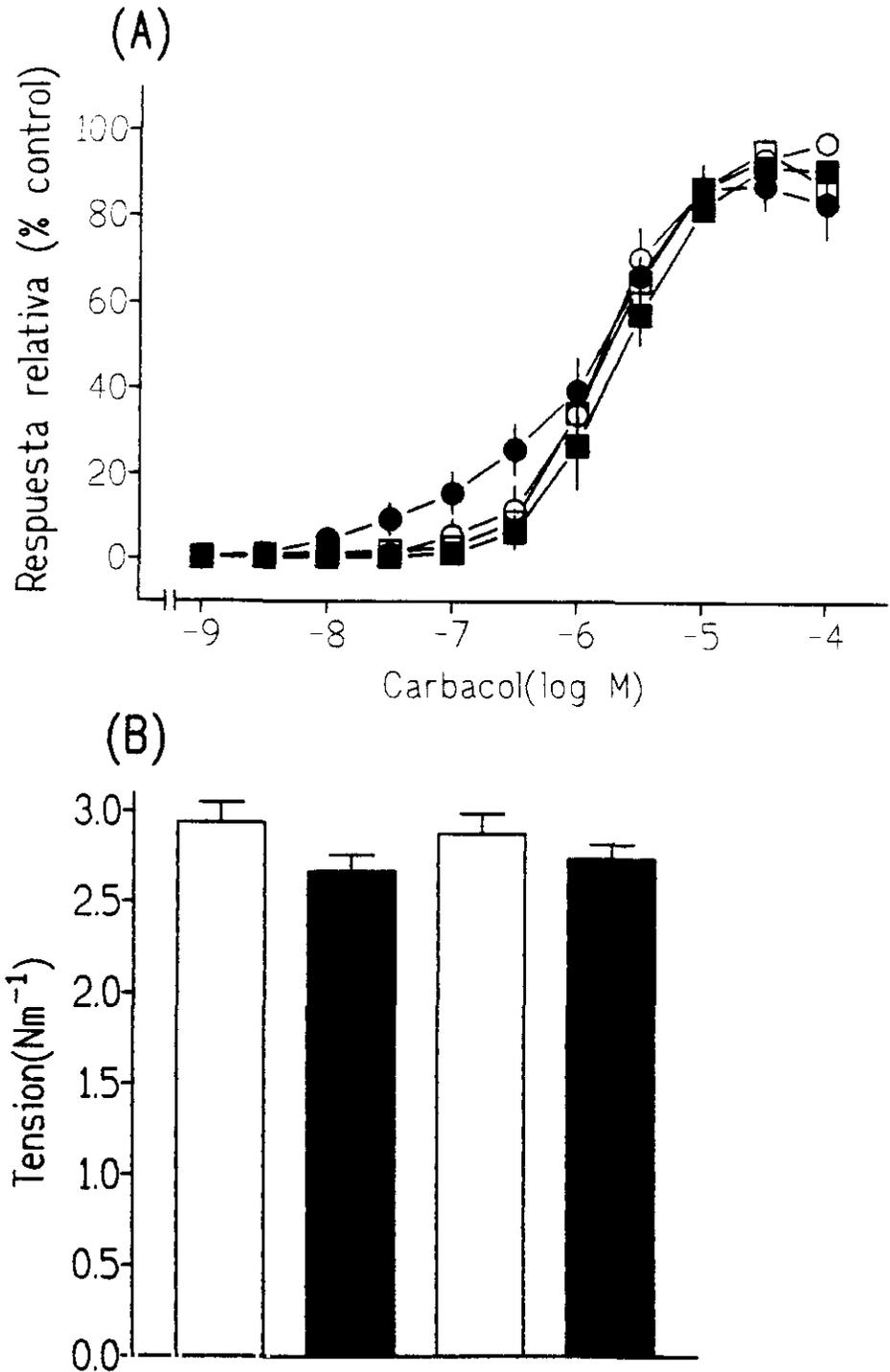


Figura 15. Reproducibilidad de la respuesta contráctil del carbacol en arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) Curvas concentración-respuesta consecutivas de carbacol (○) 1^{era} exposición (●) 2^a exposición (□) 3^a exposición (■) 4^a exposición. (B) Valores medios de la respuesta contráctil máxima al carbacol en 4 estimulaciones consecutivas. Los símbolos y las barras representan la media de 8 vasos y las líneas verticales el E.S.M.

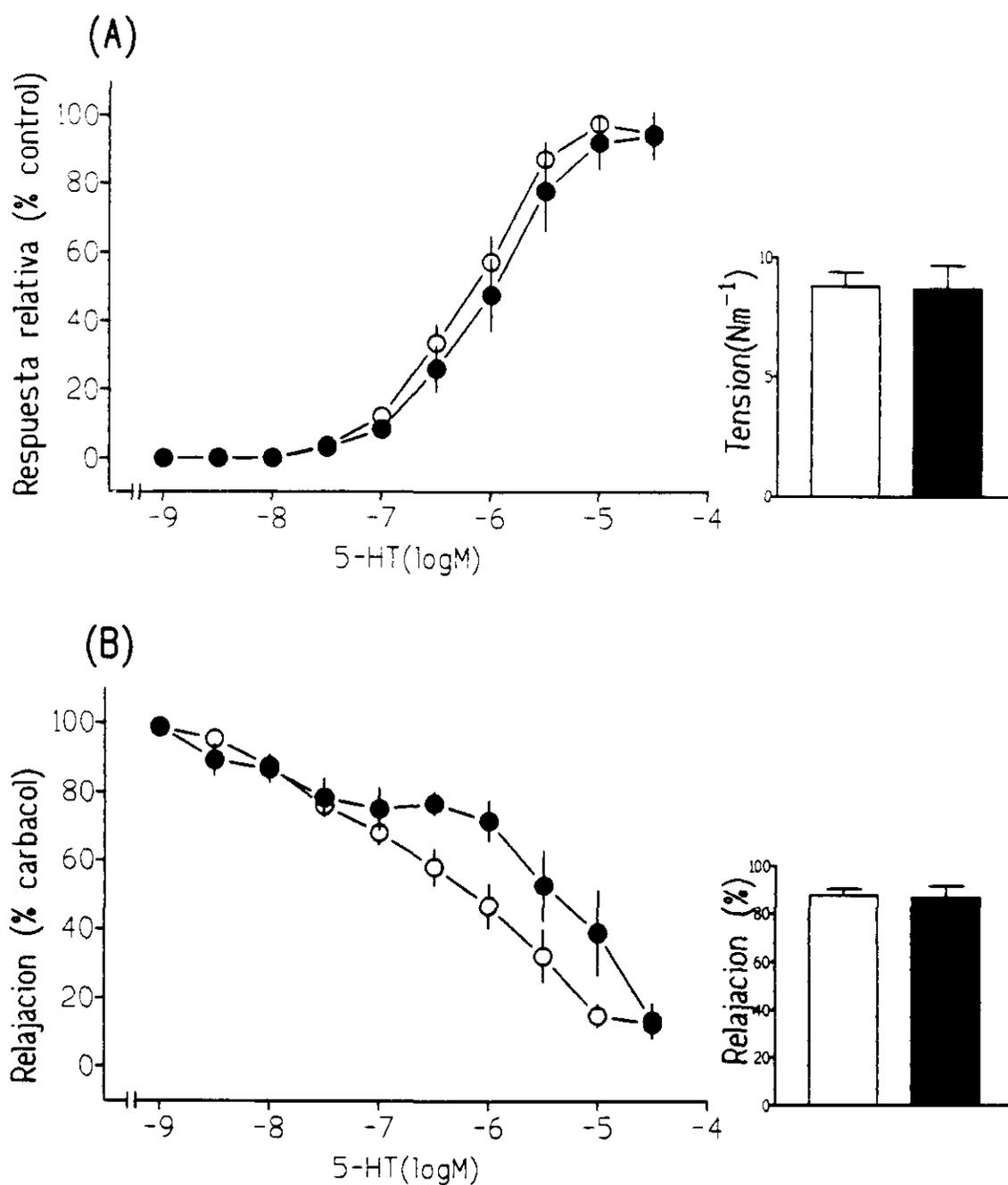


Figura 16. Variabilidad de las respuestas funcionales a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) en la circulación coronaria del cordero. (A) Curvas concentración-respuesta consecutivas a la 5-HT en segmentos proximales de la LDA (B) Curvas concentración-respuesta a la 5-HT en arterias coronarias de resistencia. (O) 1^{ra} estimulación (●) 2^a estimulación. Las barras muestran los valores máximos de contracción (A) y relajación (B) de la 5-HT en 2 estimulaciones consecutivas. Los símbolos y las barras representan la media de 5-6 experimentos y las líneas verticales el E.S.M.

Tabla 1. Parámetros de reproducibilidad de las curvas concentración- respuesta (CCR) a agonistas colinérgicos y serotonina en segmentos proximales de la LDA (A) y arterias coronarias de resistencia aisladas del ventrículo izquierdo (B) del cordero. Vasos con (+E) y sin (-E) endotelio. Primera (1.CCR), segunda (2.CCR), tercera (3.CCR) o cuarta (4.CCR) exposición a la acetilcolina (ACh), carbacol (Carb) y serotonina (5-HT).

		n	pD ₂	ΔpD ₂	E _{max} (N/m)	ΔE _{max} (N/m)
A.						
ACh	1.CCR	16	6.84±0.16	—————	4.6±0.7	—————
	2.CCR	16	6.50±0.05	0.35±0.15*	4.3±0.8	0.3±0.4
	3.CCR	9	5.76±0.29	1.26±0.26*	3.9±1.0	1.1±0.7
	4.CCR	4	5.55±0.21	0.88±0.26*	1.3±0.7	2.0±0.5*
Carb +E	1.CCR	11	5.76±0.09	—————	2.9±0.4	—————
	2.CCR	11	5.39±0.06	0.37±0.07	2.3±0.5	0.6±0.2*
Carb -E	1.CCR	7	5.52±0.11	—————	3.0±0.6	—————
	2.CCR	7	5.33±0.07	0.19±0.07*	2.0±0.6	1.0±0.2*
5-HT	1.CCR	5	6.11±0.12	—————	8.8±0.6	—————
	2.CCR	5	5.94±0.21	0.17±0.11	8.7±1.0	0.1±0.6
B.						
ACh	1.CCR	7	6.56±0.14	—————	2.3±0.4	—————
	2.CCR	7	6.68±0.20	0.12±0.22	2.3±0.4	0 ±0.3
	3.CCR	7	6.81±0.25	0.24±0.28	2.4±0.4	0.1±0.1
	4.CCR	7	6.56±0.23	0.01±0.17	2.3±0.4	0 ±0.3

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. pD₂ es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50, contracción del agonista que origina el 50% del efecto máximo (E_{max}), mientras ΔpD₂ y ΔE_{max} son las diferencias de sensibilidad y respuesta máxima entre la primera curva con la segunda, tercera o cuarta. *: P < 0.05, comparado con la primera curva control en el mismo segmento vascular (t-test pareado).

4.3 Actividad colinacetiltransferasa (ChAT) y distribución de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en la circulación coronaria

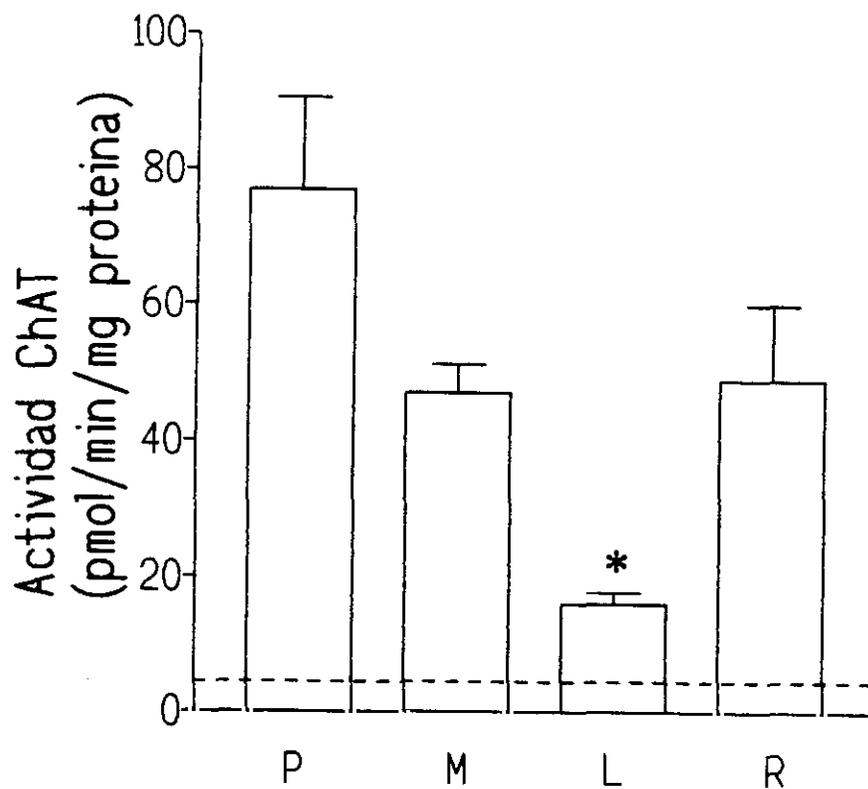


Figura 17. Valores medios de la actividad ChAT en arterias piales (P), miocardio (M), segmentos proximales de LDA (L) y arterias coronarias de resistencia (R) del cordero. Las barras representan la media \pm E.S.M. de 7-10 animales *: $P < 0.05$ con respecto a los valores en R.

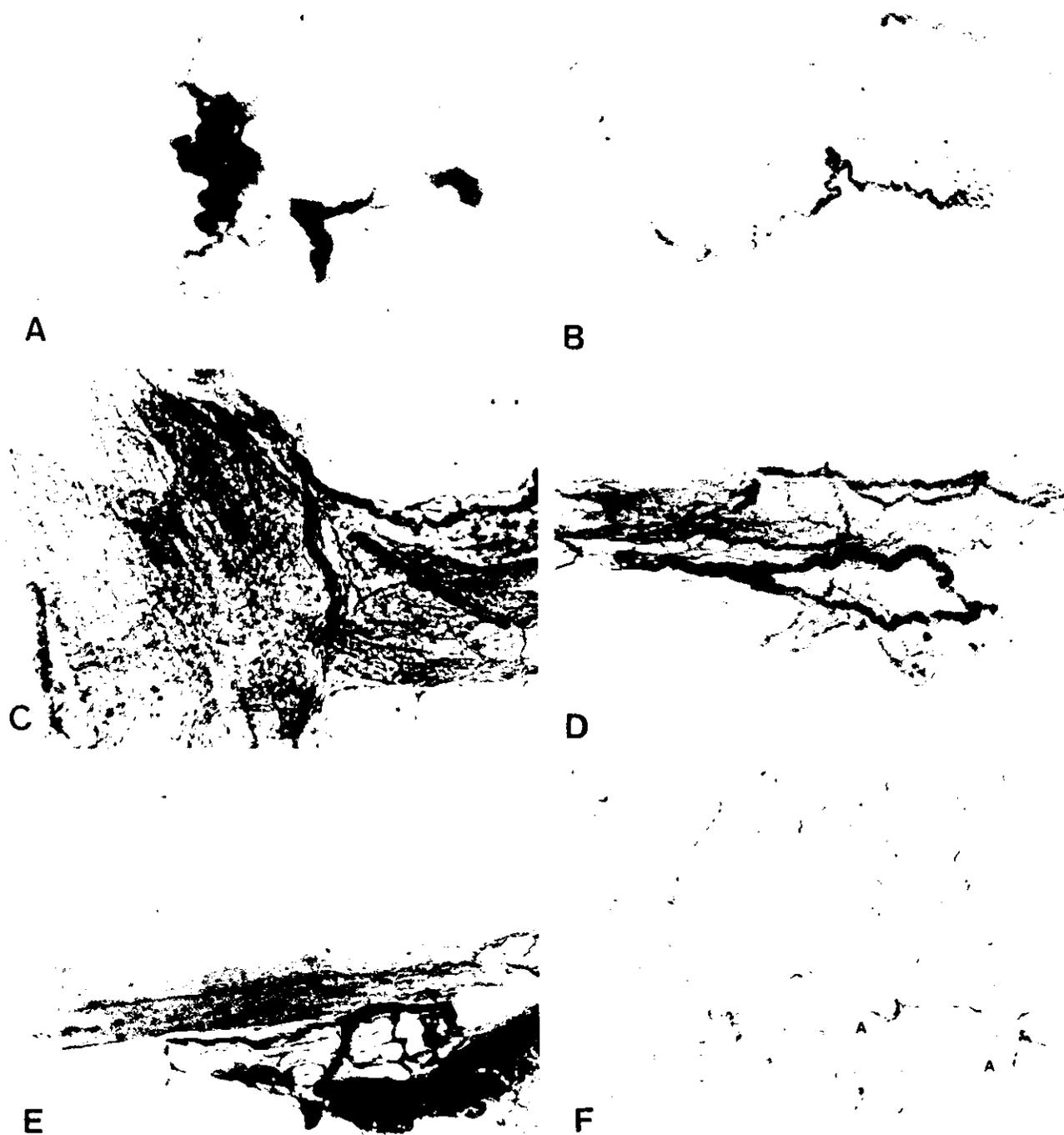


Figura 18. Sección de la arteria coronaria izquierda descendente que muestra (A) un ganglio con alta actividad AChE y (B) fibras AChE-positivas con recorrido en el músculo liso. (C) Preparación entera de una arteria coronaria de resistencia con fibras nerviosas AChE-positivas. (D-E) Arterias coronarias aisladas con una difusa distribución de fibras AChE-positivas (D) y fibras nerviosas con recorrido en la adventicia. (F) Sección del miocardio que muestra la distribución de las fibras AChE-positivas en el músculo cardíaco, especialmente densa cerca de las arterias pequeñas (A). (A, C, E) 340 X. (B, D, F) 150 X.

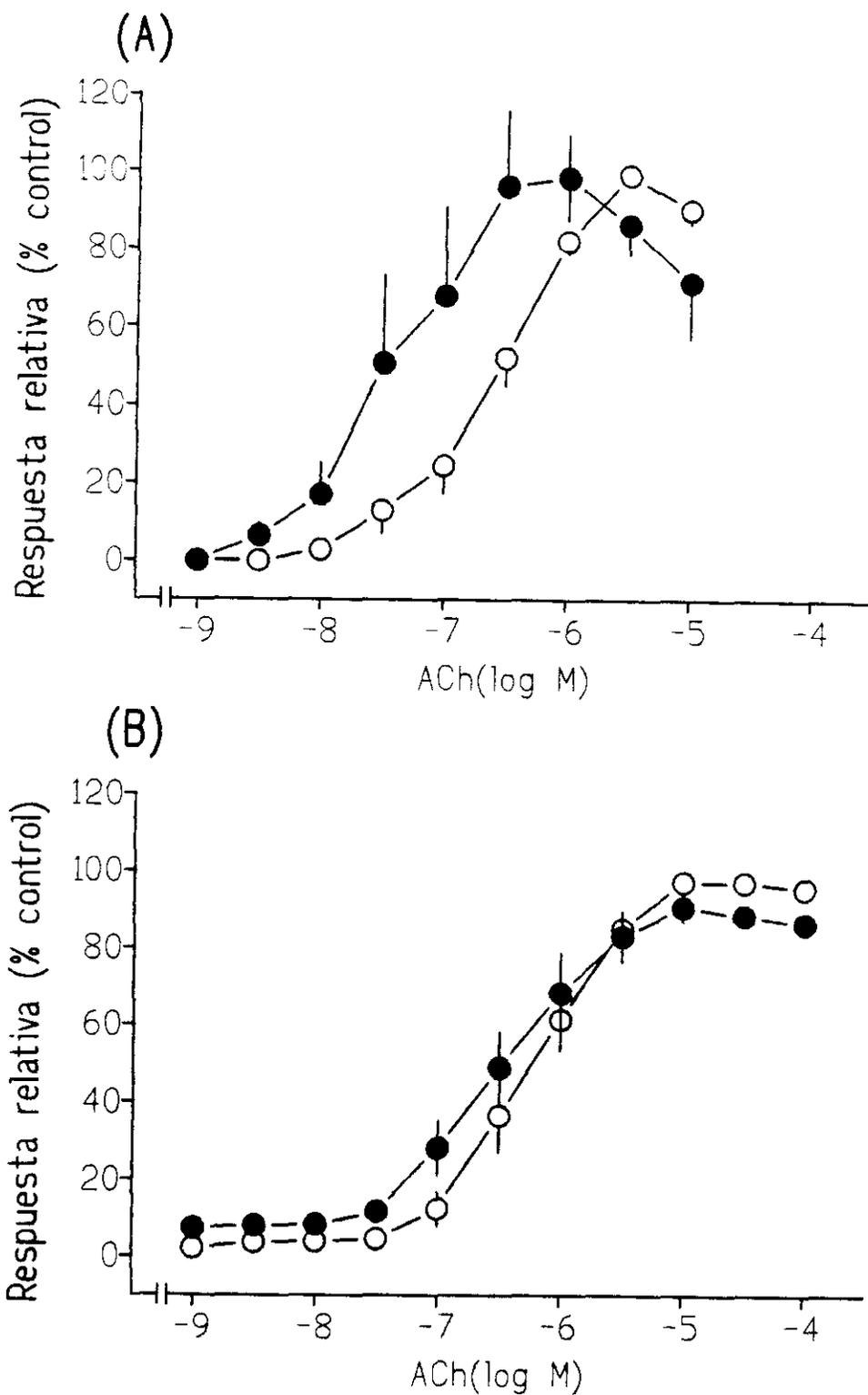
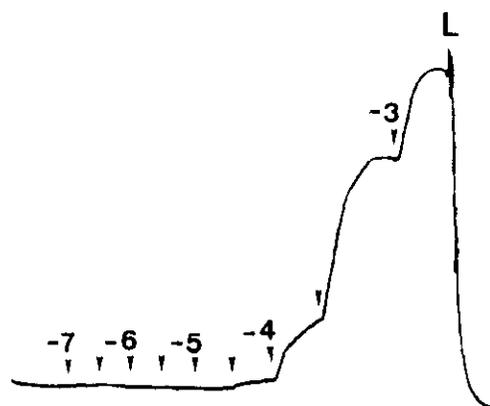


Figura 19. Efecto del inhibidor de la AChE, neostigmina, sobre las contracciones de la ACh en segmentos proximales de la LDA (A) y arterias coronarias de resistencia del cordero (B). (○) Controles (●) En presencia de 10^{-7} M neostigmina. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 7-10 experimentos.

A



B

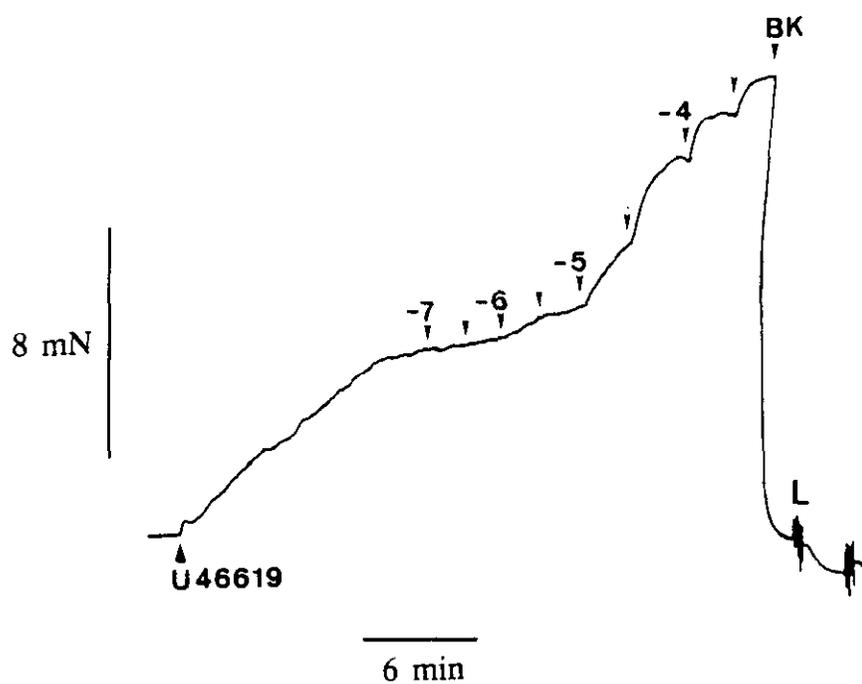


Figura 20. Registro isométrico que muestra (A) el efecto contráctil directo de la fisostigmina en una arteria coronaria de resistencia del cordero y (B) la ausencia de efecto relajante en una arteria precontraída con el análogo del tromboxano U46619, que relaja a la bradiquinina (BK). L: Lavado. Las escalas verticales representan fuerza en mN y las horizontales tiempo en minutos.

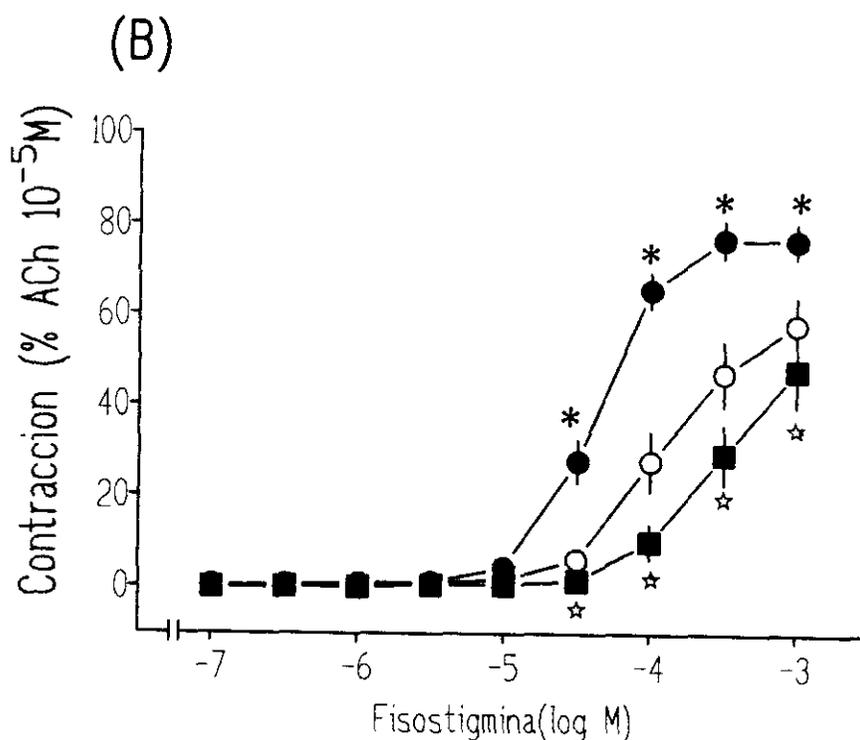
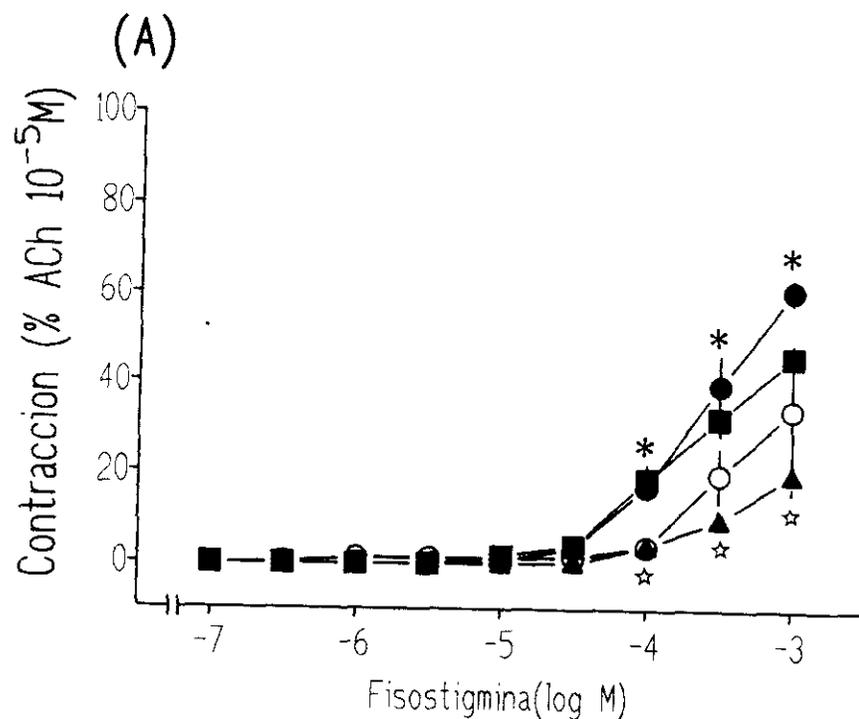


Figura 21. Efecto contráctil de la fisostigmina en (A) segmentos proximales de la LDA y (B) en arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) Arterias con endotelio intacto. (●) Arterias sin endotelio. (■) Arterias sin endotelio en presencia de atropina (10^{-6} M). (▲) Arterias sin endotelio en presencia de atropina (10^{-5} M). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 4-8 experimentos. * $P < 0.05$ comparado con vasos con endotelio. * $P < 0.05$ comparado con vasos sin endotelio en ausencia de atropina.

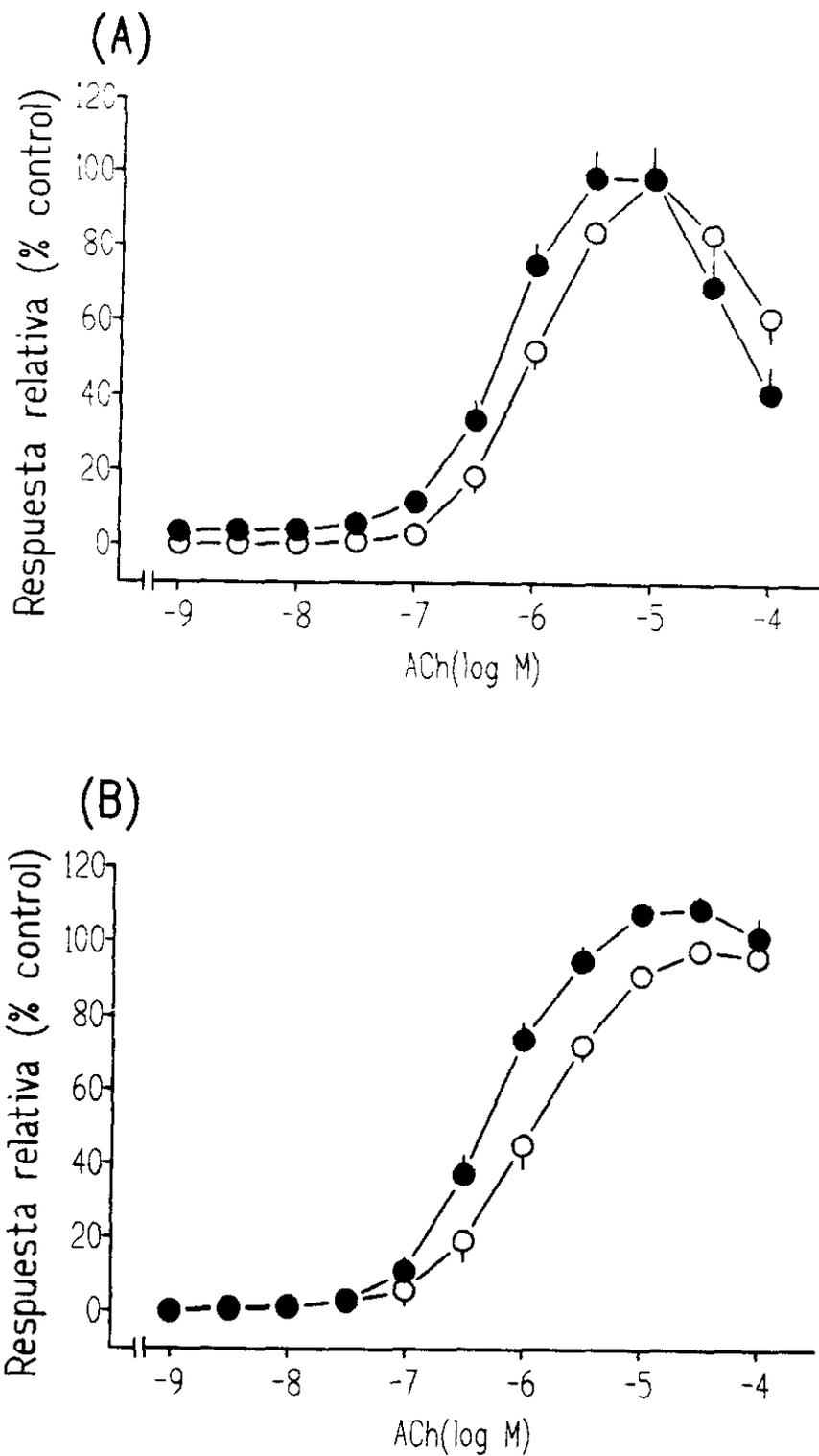


Figura 22. Efecto de la fisostigmina sobre la respuesta contráctil a la ACh en segmentos proximales de la LDA del cordero (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio. (○) Controles. (●) En presencia de fisostigmina (10⁻⁶M). Los símbolos representan la media ± E.S.M. de 8-12 experimentos.

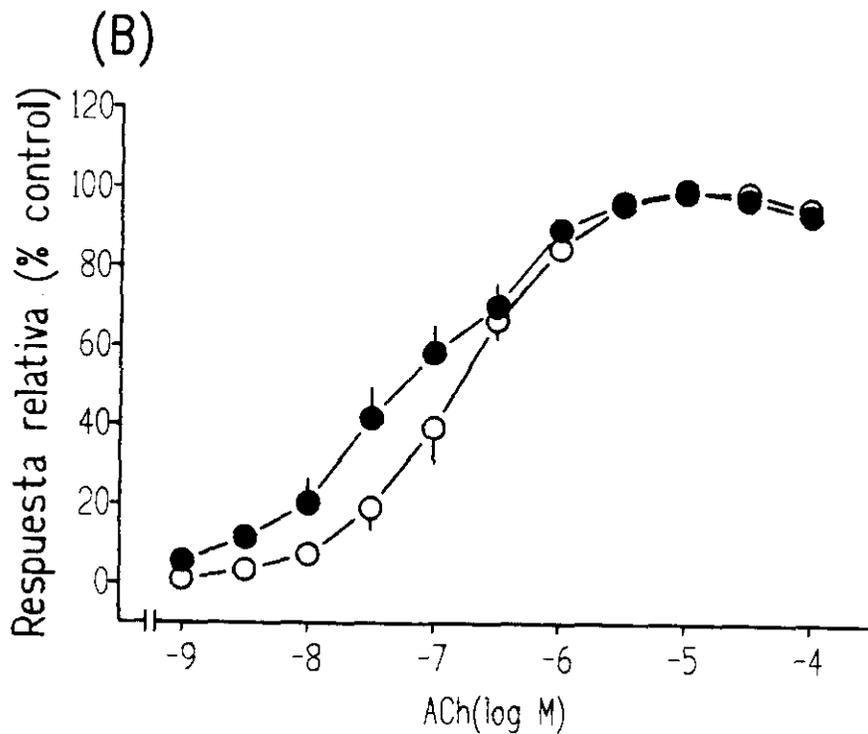
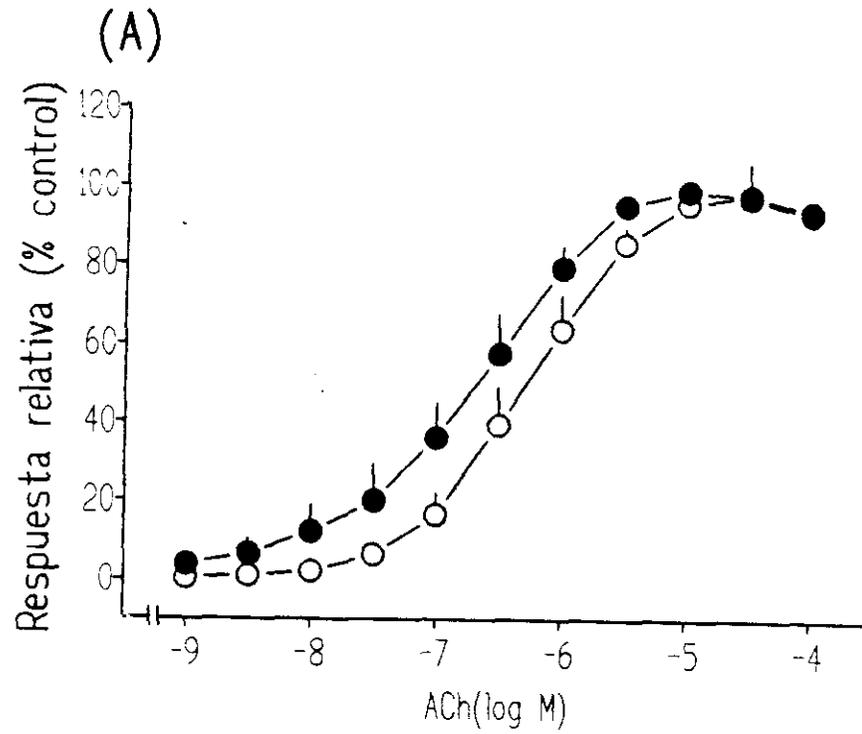


Figura 23. Efecto de la fisostigmina sobre la respuesta contráctil a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio. (○) Controles (●) En presencia de fisostigmina (10^{-6} M). Los símbolos representan la media de 8 experimentos.

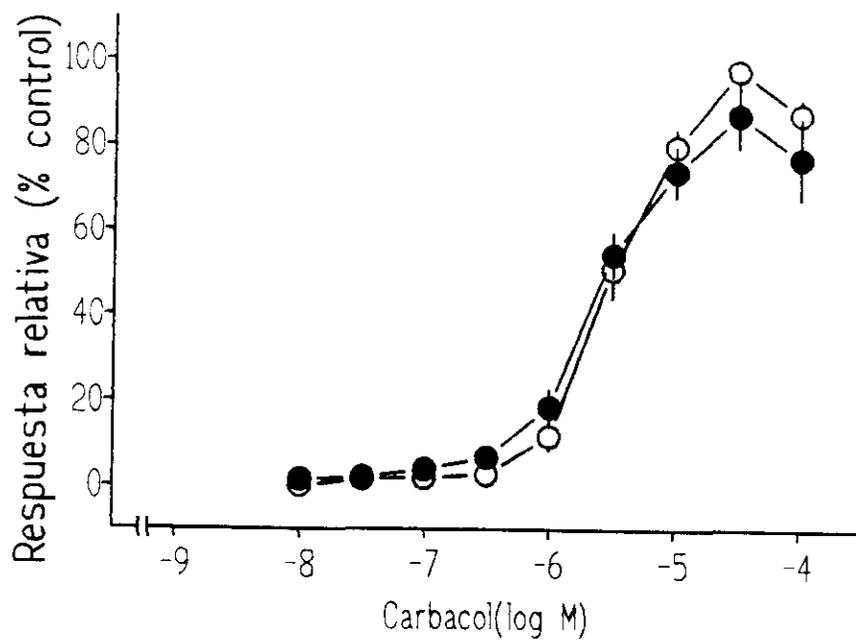


Figura 24. Efecto de la fisostigmina sobre la respuesta al carbacol de las arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) Controles (●) En presencia de fisostigmina (10^{-6} M). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 8 experimentos.

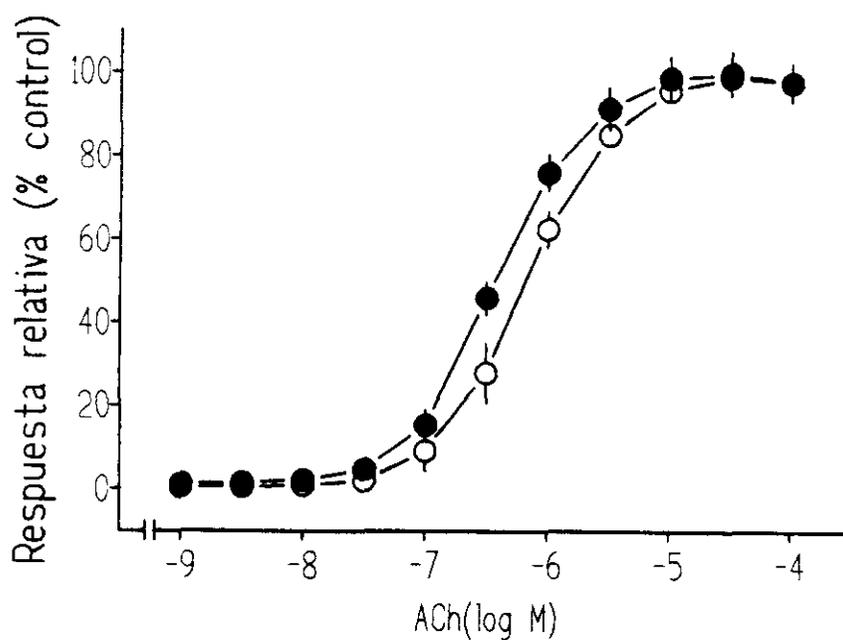


Figura 25. Efecto del inhibidor de la butirilcolinesterasa, ISO-OMPA, sobre las respuestas a la ACh en las arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) Controles (●) En presencia de ISO-OMPA ($5 \times 10^{-5} M$). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 7 experimentos.

Tabla 2. Efecto de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) con neostigmina (10^{-7} M) y fisostigmina (10^{-6} M) o de butirilcolinesterasa con ISO-OMPA (5×10^{-5} M) sobre las curvas concentración-respuesta a la ACh en segmentos proximales de LDA y de arterias coronarias de resistencia aislados del ventrículo izquierdo del cordero. El efecto de la fisostigmina fue examinado en vasos con (+E) y sin (-E) endotelio.

		n	pD_2	ΔpD_2	E_{max} (N/m)	ΔE_{max} (N/m)
A. LDA						
Control	+E	10	6.58 ± 0.12	—————	8.1 ± 1.7	—————
Neostigmina		10	7.02 ± 0.17	$0.44 \pm 0.16^*$	8.5 ± 1.5	0.3 ± 0.6
Control	+E	12	6.02 ± 0.07	—————	2.9 ± 0.3	—————
Fisostigmina		12	6.42 ± 0.07	$0.39 \pm 0.06^*$	2.8 ± 0.1	0.1 ± 0.2
Control	-E	8	5.94 ± 0.12	—————	3.0 ± 0.4	—————
Fisostigmina		8	6.26 ± 0.07	$0.32 \pm 0.08^*$	3.4 ± 0.5	$0.4 \pm 0.1^*$
B. Arterias de resistencia						
Control	+E	7	6.23 ± 0.14	—————	2.0 ± 0.3	—————
Neostigmina		7	6.34 ± 0.21	0.11 ± 0.15	1.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1
Control	+E	8	6.25 ± 0.15	—————	4.1 ± 0.4	—————
Fisostigmina		8	6.88 ± 0.23	$0.63 \pm 0.13^*$	4.0 ± 0.4	0.1 ± 0.2
Control	-E	8	6.85 ± 0.14	—————	3.0 ± 0.5	—————
Fisostigmina		8	7.26 ± 0.17	$0.41 \pm 0.07^*$	2.9 ± 0.5	0.1 ± 0.1
Control	+E	7	6.20 ± 0.11	—————	2.2 ± 0.4	—————
ISO-OMPA		7	6.38 ± 0.06	0.17 ± 0.10	2.2 ± 0.4	0 ± 0.1
Control	+E	5	6.56 ± 0.17	—————	1.8 ± 0.4	—————
Colina		5	6.90 ± 0.13	$0.34 \pm 0.09^*$	1.9 ± 0.5	0.1 ± 0.1

Los valores se expresan como media \pm E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados.

pD_2 es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50, concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo (E_{max}), mientras ΔpD_2 y ΔE_{max} son las diferencias entre una primera curva control y una segunda curva en presencia del tratamiento.

4.4 Respuestas a la estimulación eléctrica transmural

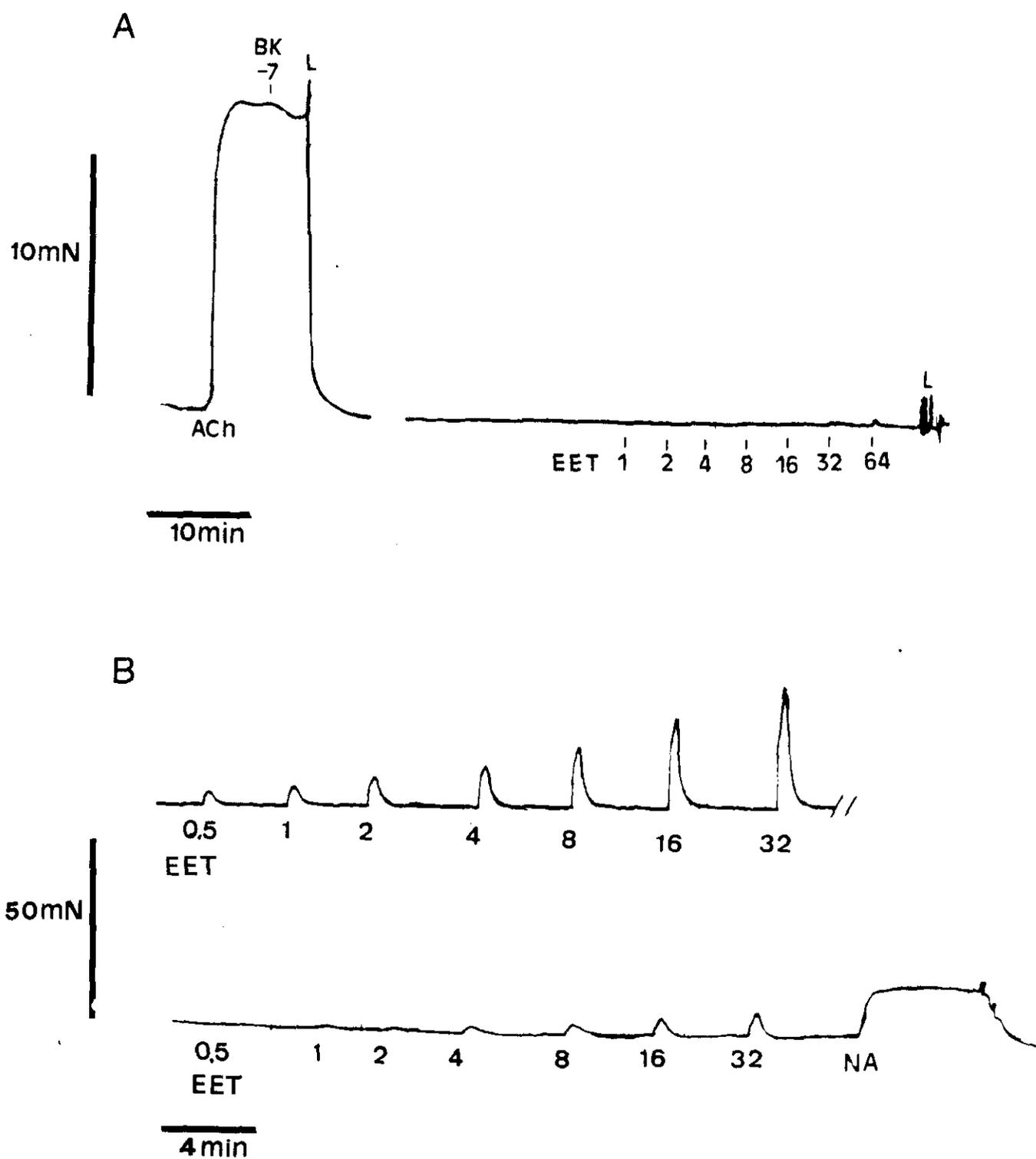


Figura 26. (A) Registro isométrico que muestra la falta de efecto contráctil de la estimulación eléctrica transmural (EET) sobre la tensión basal de una arteria coronaria de resistencia del cordero, que contrae a la estimulación con ACh exógena. (B). La aplicación de los mismos parámetros de estimulación eléctrica a una arteria peneana de resistencia del caballo muestra contracción a la estimulación eléctrica que es sensible al bloqueo con el antagonista α_1 -adrenérgico, prazosin (10^{-7} M). Las escalas verticales representan la fuerza (mN) y las horizontales tiempo (min).

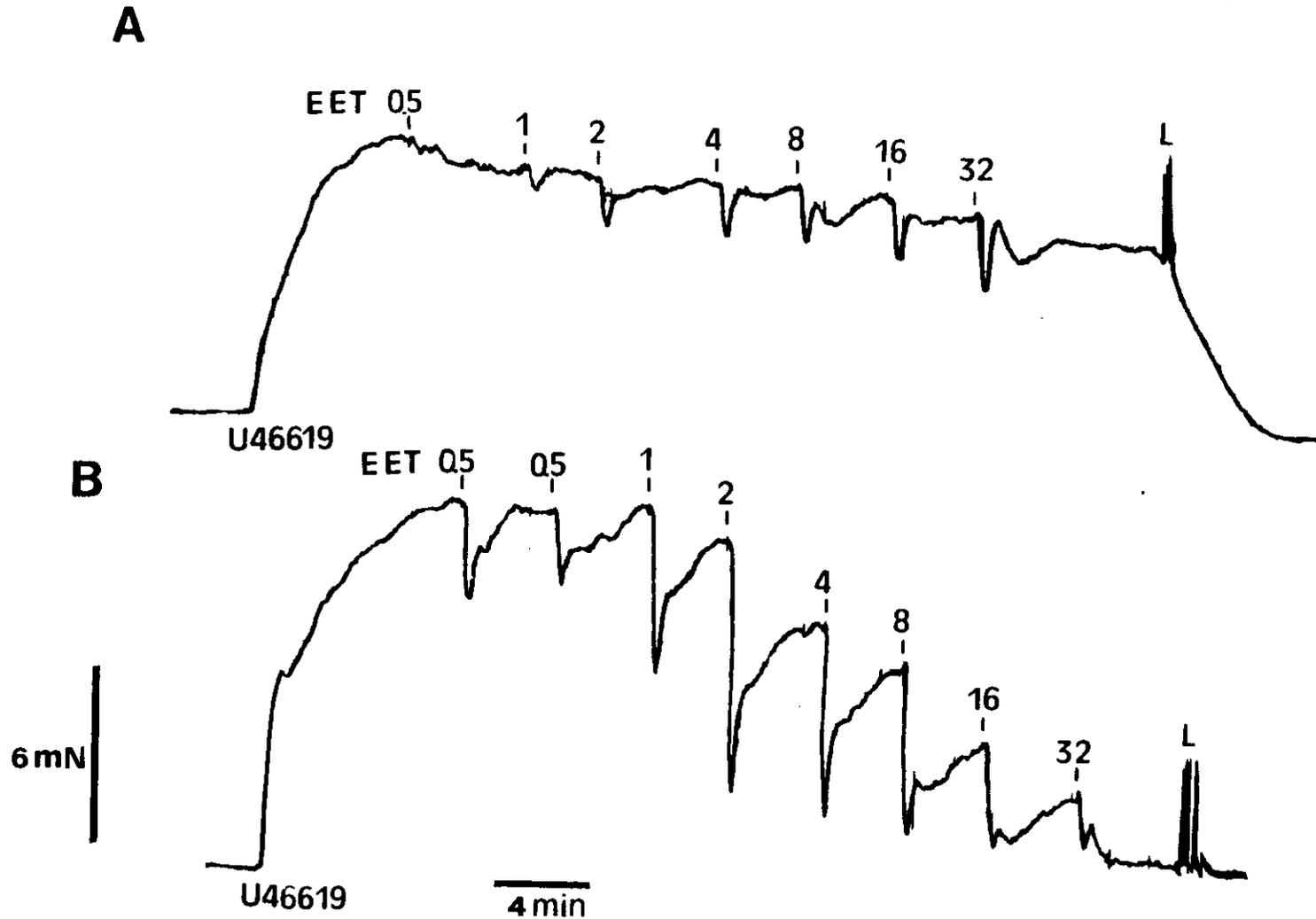


Figura 27. Registro isométrico que muestra el efecto de la estimulación eléctrica transmural (EET) sobre una arteria coronaria de resistencia del cordero precontraída con U46619 (A) en ausencia y (B) en presencia de atropina ($10^{-6} M$). La preparación fue incubada previamente con fentolamina ($3 \times 10^{-6} M$) para bloquear los receptores α -adrenérgicos. L: Lavado. La escala vertical indica fuerza (mN) y la horizontal tiempo (minutos).

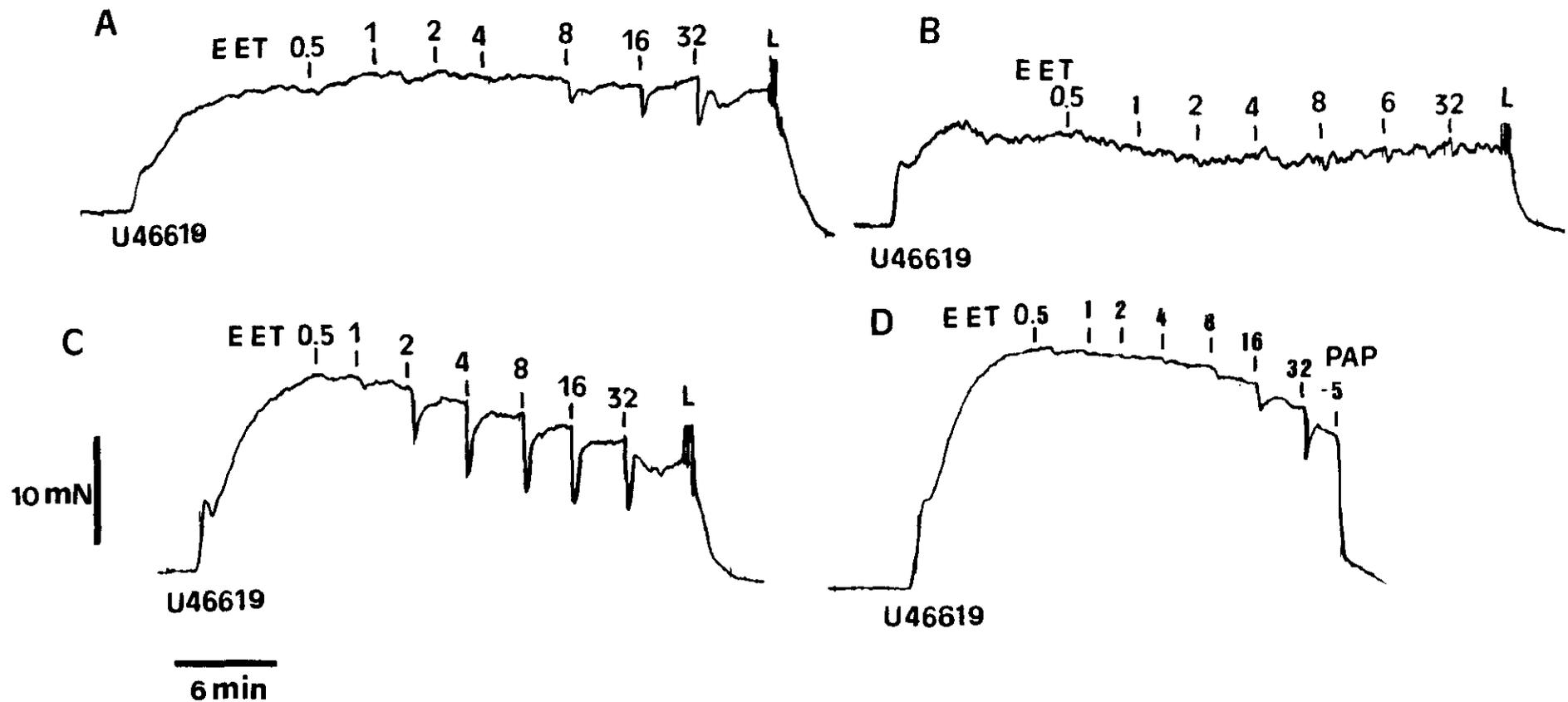


Figura 28. Registro isométrico que muestra el efecto de la estimulación eléctrica transmural sobre una arteria coronaria de resistencia (A) en condiciones control (B) en presencia de fisostigmina ($10^{-6}M$) (C) en presencia de atropina ($10^{-6}M$) y (D) en presencia de tetrodotoxina ($3 \times 10^{-6}M$). L: Lavado. La escala vertical indica fuerza (mN) y la horizontal tiempo (minutos).

Tabla 3. Efecto de la fisostigmina (10^{-6} M), atropina (10^{-6} M), tetrodotoxina (TTX 10^{-6} M) y propranolol (3×10^{-6} M) sobre las relajaciones inducidas por la estimulación eléctrica en arterias coronarias de resistencia del cordero precontraídos con U46619. Control 1 indica que los experimentos fueron hechos en la presencia de fentolamina (3×10^{-6} M); Control 2 indica la presencia de fentolamina más fisostigmina (10^{-6} M); Control 3 indica la presencia de fentolamina, fisostigmina y atropina (10^{-6} M).

	n	FE ₅₀ (Hz)	Relajación máxima (%)
Control 1	6	5.2 ± 1.1	27.7 ± 4.7
Fisostigmina	6	4.7 ± 1.2	31.5 ± 8.8
Control 2	6	5.2 ± 1.3	35.3 ± 3.6
Atropina	6	1.9 ± 0.6*	64.9 ± 4.4*
Control 3	5	1.7 ± 0.9	68.1 ± 2.3
TTX	5	11.0 ± 3.9*	28.6 ± 5.1*
Control 3	6	1.8 ± 0.5	43.3 ± 9.0
Propranolol	6	1.9 ± 0.3	47.0 ± 9.2

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. FE₅₀, es la frecuencia de la estimulación eléctrica que origina el 50% de relajación máxima. La relajación máxima se ha expresado en porcentaje de la preconstricción inducida por U46619 en las arterias coronarias de resistencia.

* P < 0.05, parámetro significativamente diferente del parámetro en una primera curva control (t-test pareado).

4.5 Caracterización del receptor muscarínico contráctil

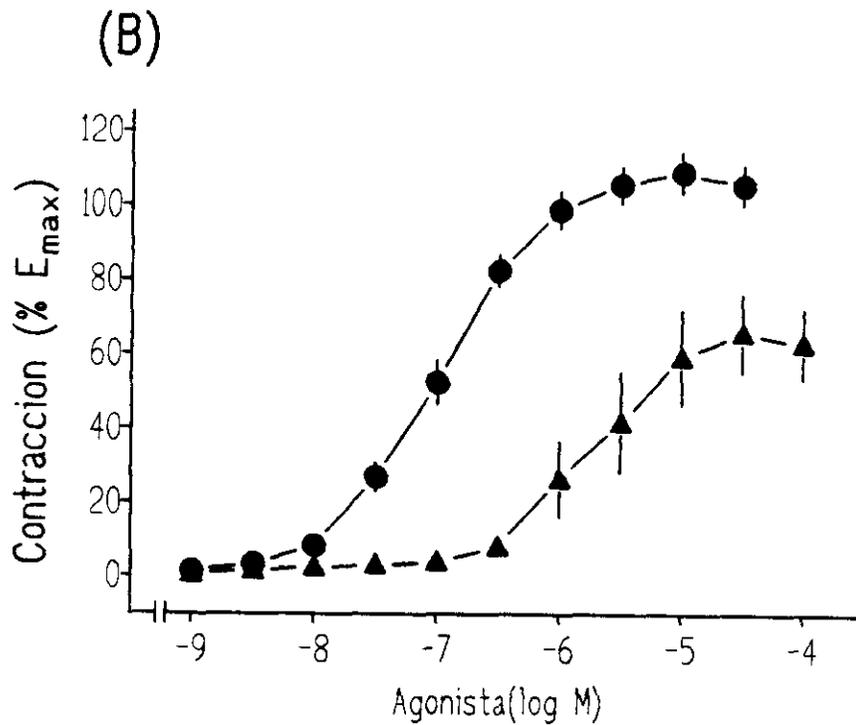
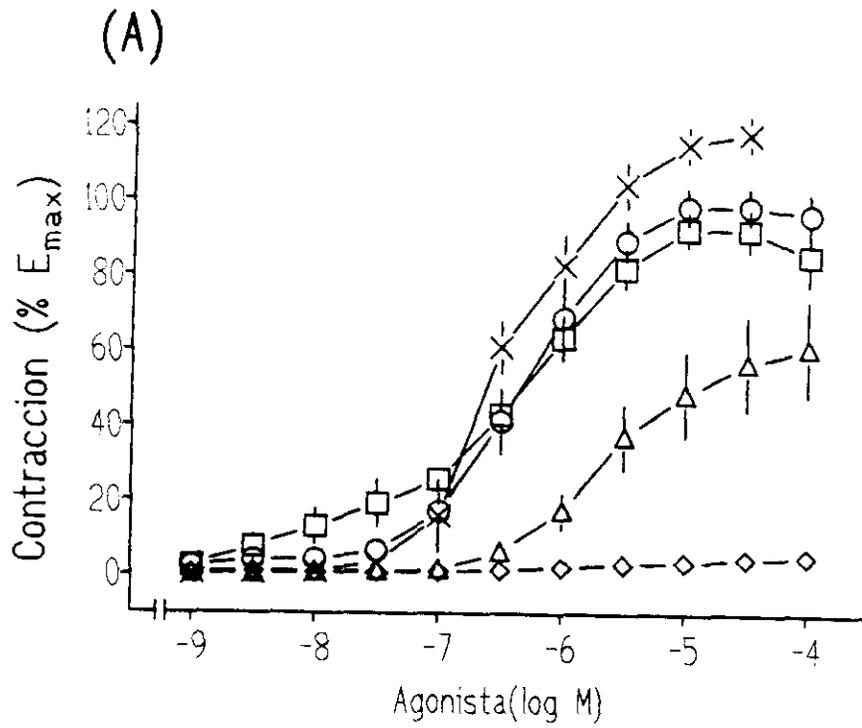


Figura 29. Curvas concentración-respuesta a los agonistas colinérgicos que inducen contracción en las arterias coronarias de resistencia del cordero (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio. (○) ACh, (□) metacolina, (Δ) carbacol, (◇) McN-A-343, (*) oxotremorina, (●) ACh, (▲) carbacol. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6-14 preparaciones.

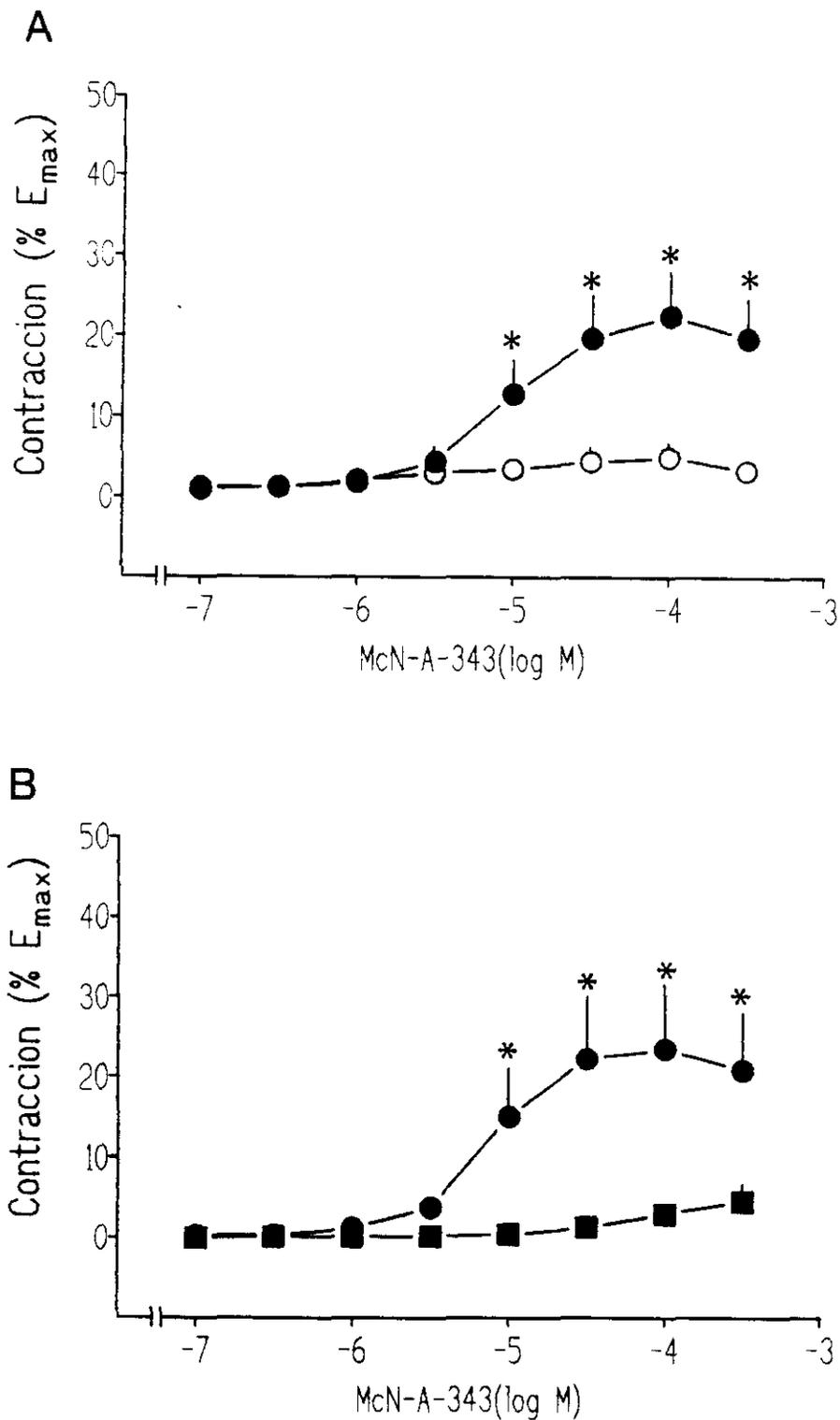


Figura 30. Curvas concentración-respuesta al agonista M_1 , McN-A-343, en arterias coronarias de resistencia del cordero con endotelio intacto. (A) El McN-A-343 solo no produce contracción significativa sobre la tensión basal (○), pero sí en presencia de 10 mM K^+ (●). (B) La respuesta contráctil del McN-A-343 en presencia de PSS con 10 mM K^+ (■) es bloqueada en presencia de pFHHSiD (10^{-7} M). El efecto contráctil se expresa como porcentaje de la E_{max} . Cada punto es la media de 5-14 vasos. * $P < 0.05$.

Tabla 4. Respuesta contráctil de la ACh y otros agonistas colinérgicos en arterias coronarias de resistencia de cordero con endotelio intacto (+E) y sin endotelio (-E).

+E	n	pD ₂	E _{max} Nm ⁻¹	Pendiente	Rp	l ₁ μm
ACh	11	6.31±0.11	2.14±0.24	1.42±0.09	1.0	276±25
Metacolina	7	6.49±0.19	2.33±0.30	0.78±0.10	1.0	281±30
Carbacol	12	5.75±0.20 ^{ab}	1.70±0.39	1.16±0.15	6.7	323±19
McN-A-343 ⁺	9	4.93±0.09 ^{ab}	0.59±0.17 ^{abc}	1.70±0.27	248	381±32
Oxotremorina M	6	6.33±0.11 ^{cd}	3.04±0.34 ^{acd}	1.34±0.11	0.6	276±23
-E						
ACh	14	7.03±0.07*	2.61±0.37	1.1±0.06	0.2	296±27
Carbacol	8	5.78±0.33	1.42±0.19	2.3±0.4	4.9	316±27

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. pD₂ es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50, concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo (E_{max}). La pendiente ha sido determinado con la ecuación de Hill. l₁ es el diámetro de la luz de los segmentos arteriales intramiocárdicos. La potencia relativa, Rp es la relación entre concentraciones equiactivas utilizando la respuesta a la ACh en arterias con endotelio intacto como referencia. +: Las curvas concentración-respuesta al McN-A-343 fueron obtenidas en presencia de 10mM K⁺ en PSS. Parámetro significativamente diferente, utilizando el método de Bonferroni: a: P < 0.05, versus ACh; b: P < 0.05 versus metacolina; c: P < 0.05 versus carbacol; d: P < 0.05 versus McN-A-343.

* P < 0.05, parámetro significativamente diferente del parámetro en vasos con endotelio intacto.

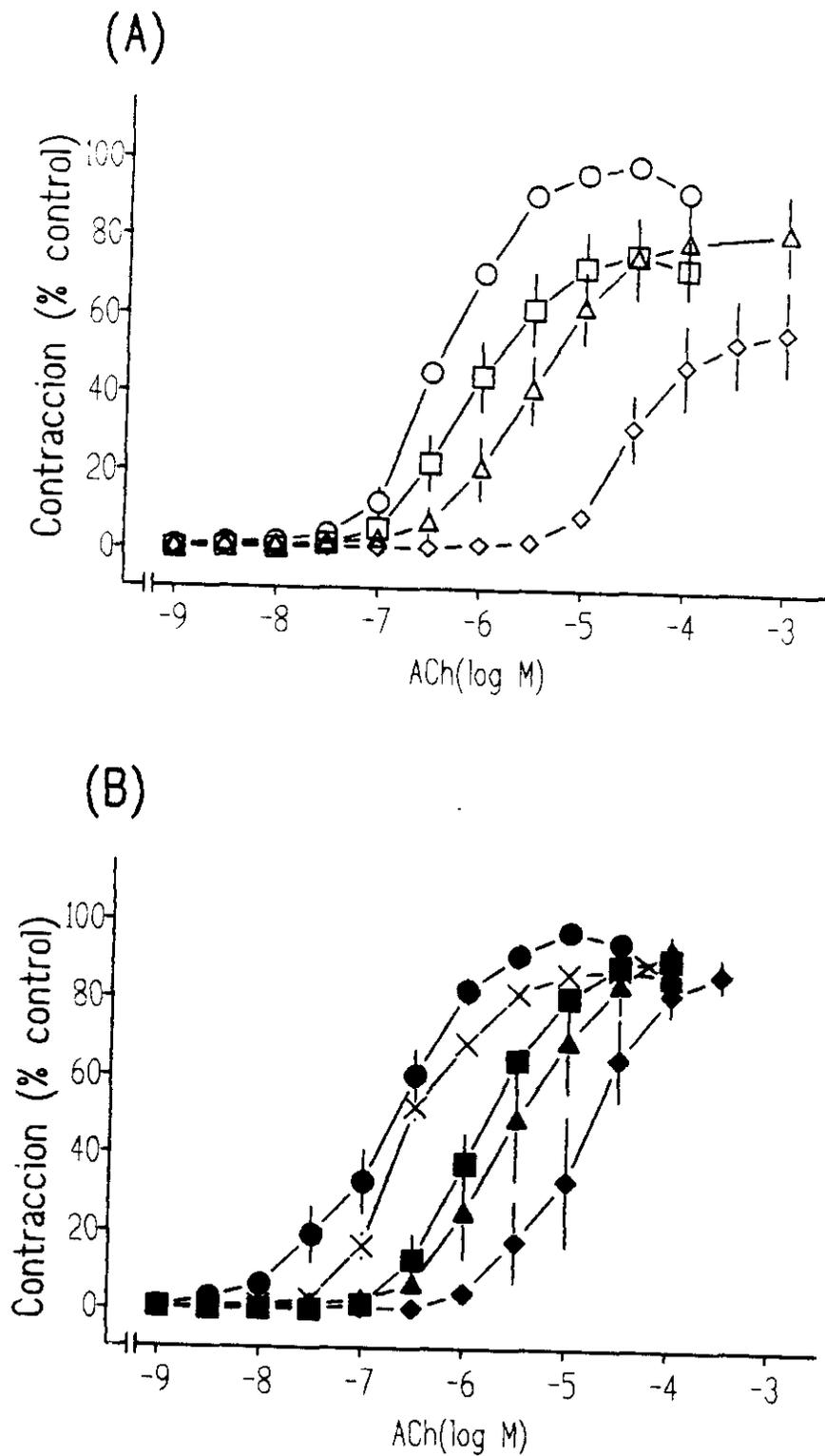


Figura 31. Curvas concentración-respuesta a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordewro (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio, en ausencia (O, ●) y en presencia de concentraciones crecientes del antagonista muscarínico selectivo- M_1 , pirencepina: (*) $10^{-7}M$, (□, ■) $3 \times 10^{-7}M$, (△, ▲) $10^{-6}M$, (◇, ◆) $3 \times 10^{-6}M$. Los símbolos representan la media \pm E.S.M de 8-13 experimentos.

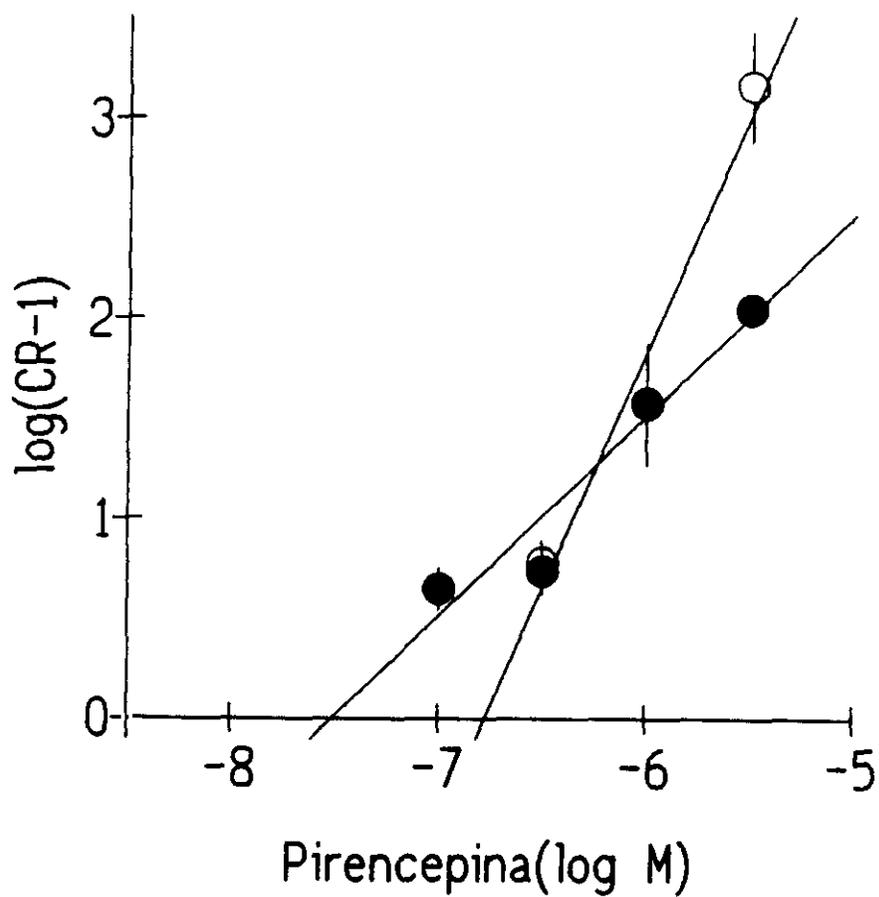


Figura 32. Análisis de regresión de Schild para el antagonismo de la pirenzepina sobre el efecto contráctil de la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero (O) con endotelio intacto y (●) sin endotelio. Los puntos representan la media \pm E.S.M de 8-13 vasos.

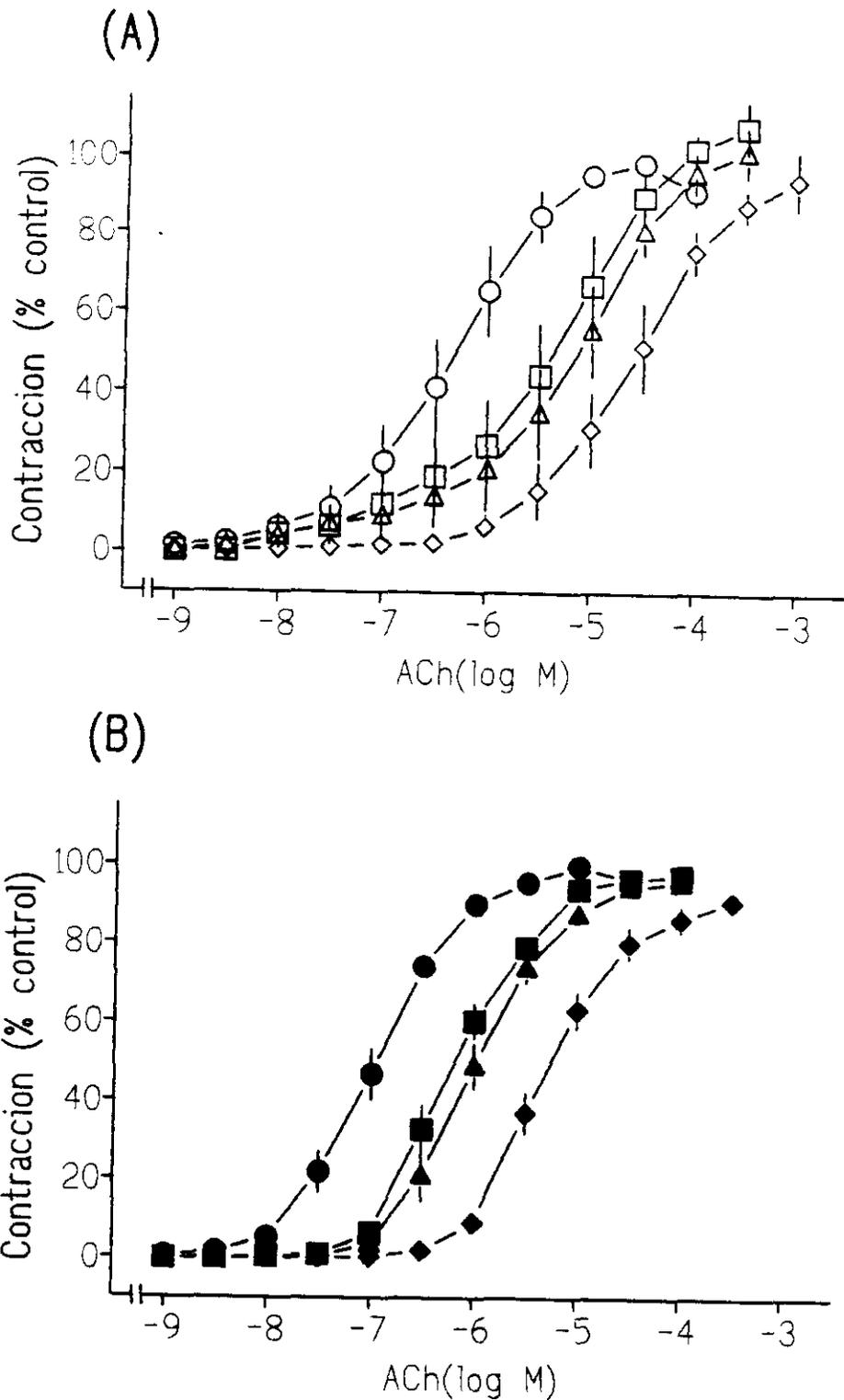


Figura 33. Curvas concentración-respuesta a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio, en ausencia (○, ●) y en presencia de concentraciones crecientes del antagonista muscarínico selectivo-M₂, AFDX 116: (□, ■) 3x10⁻⁶M, (△, ▲) 10⁻⁵M, (◇, ◆) 3x10⁻⁵M. Los símbolos representan la media ± E.S.M. de 6 experimentos.

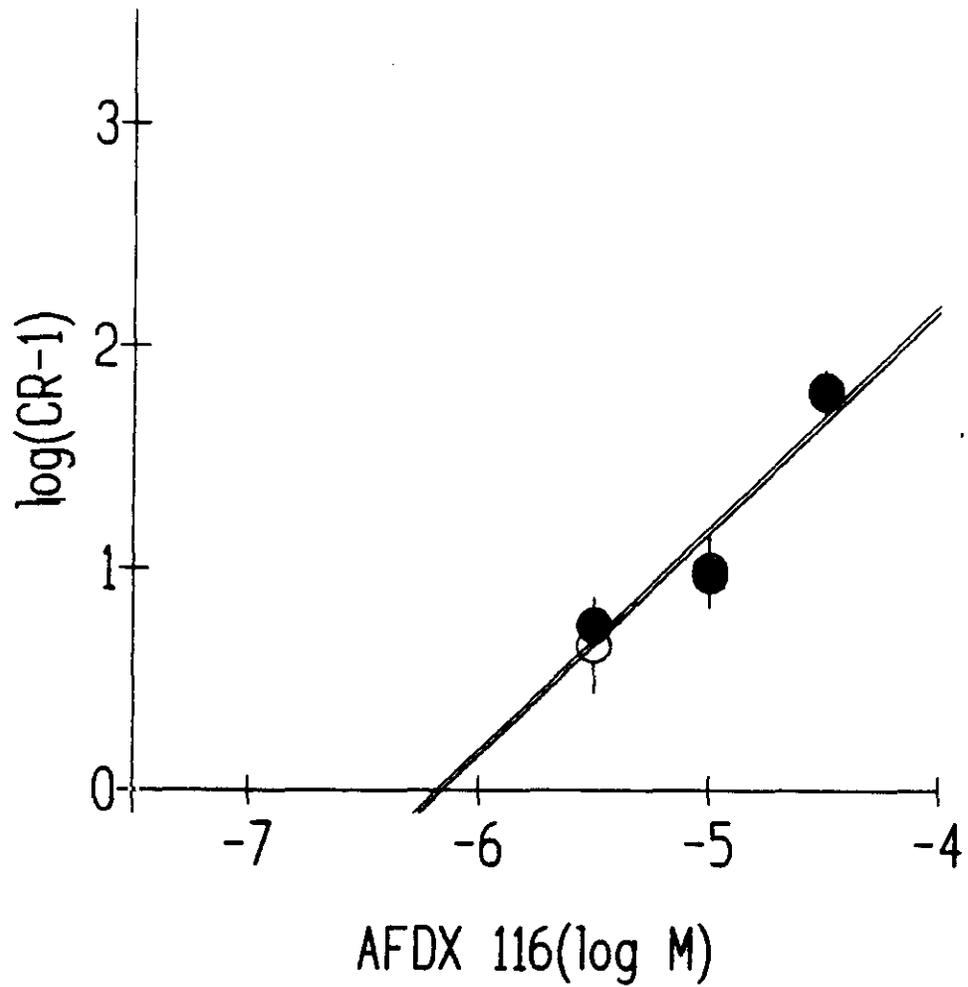


Figura 34. Análisis de regresión de Schild para el antagonismo del AFDX-116 sobre el efecto contráctil de la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero con (○) y sin endotelio (●). Los puntos representan la media \pm E.S.M. de 6 vasos.

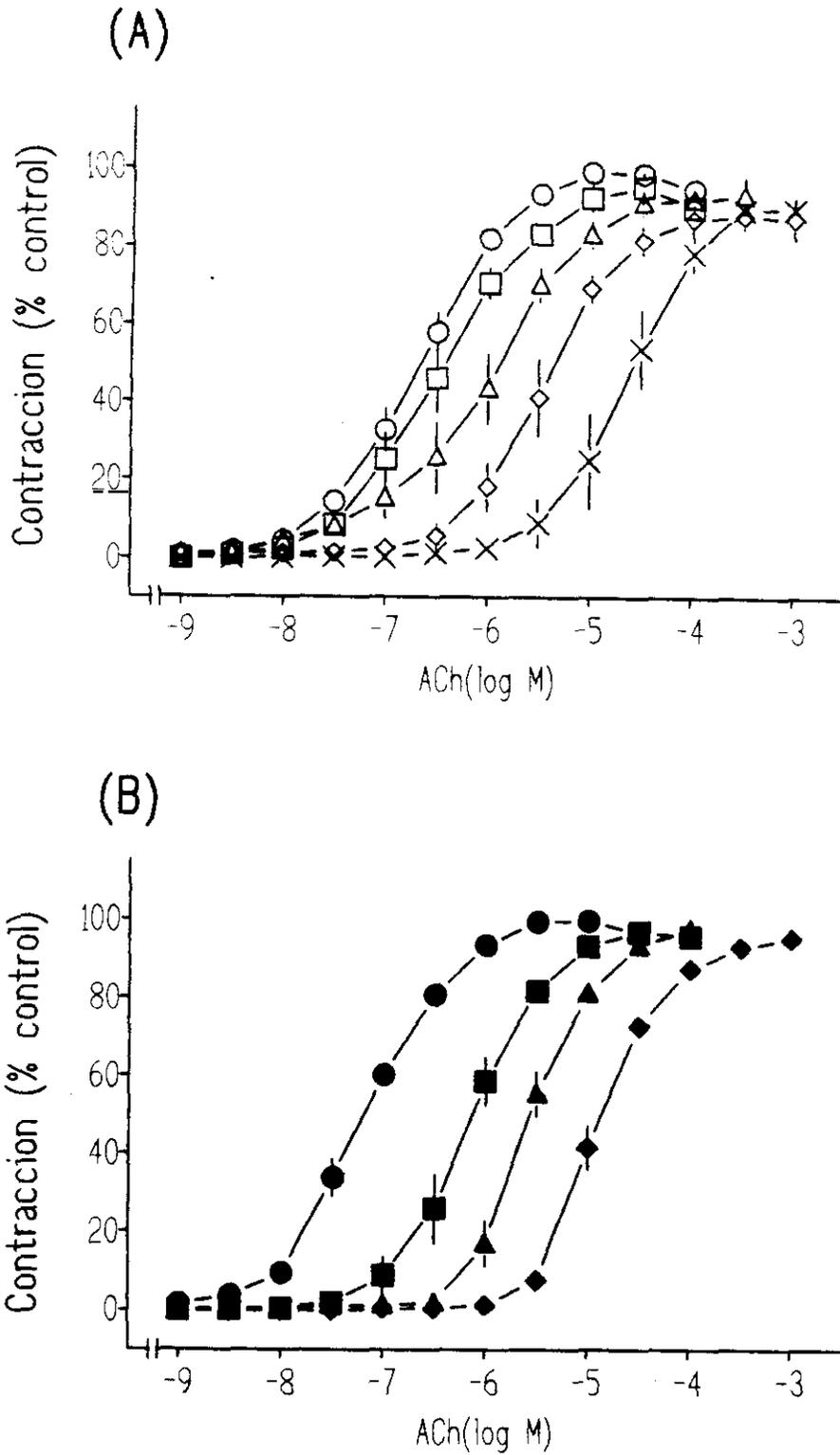


Figura 35. Curvas concentración-respuesta a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) con endotelio intacto y (B) sin endotelio, en ausencia (○, ●) y en presencia de concentraciones crecientes del antagonista muscarínico selectivo- M_3 , pFHHSiD: (□, ■) $3 \times 10^{-8} M$, (△, ▲) $10^{-7} M$, (◇, ◆) $3 \times 10^{-7} M$, (*) $10^{-6} M$. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6-7 experimentos.

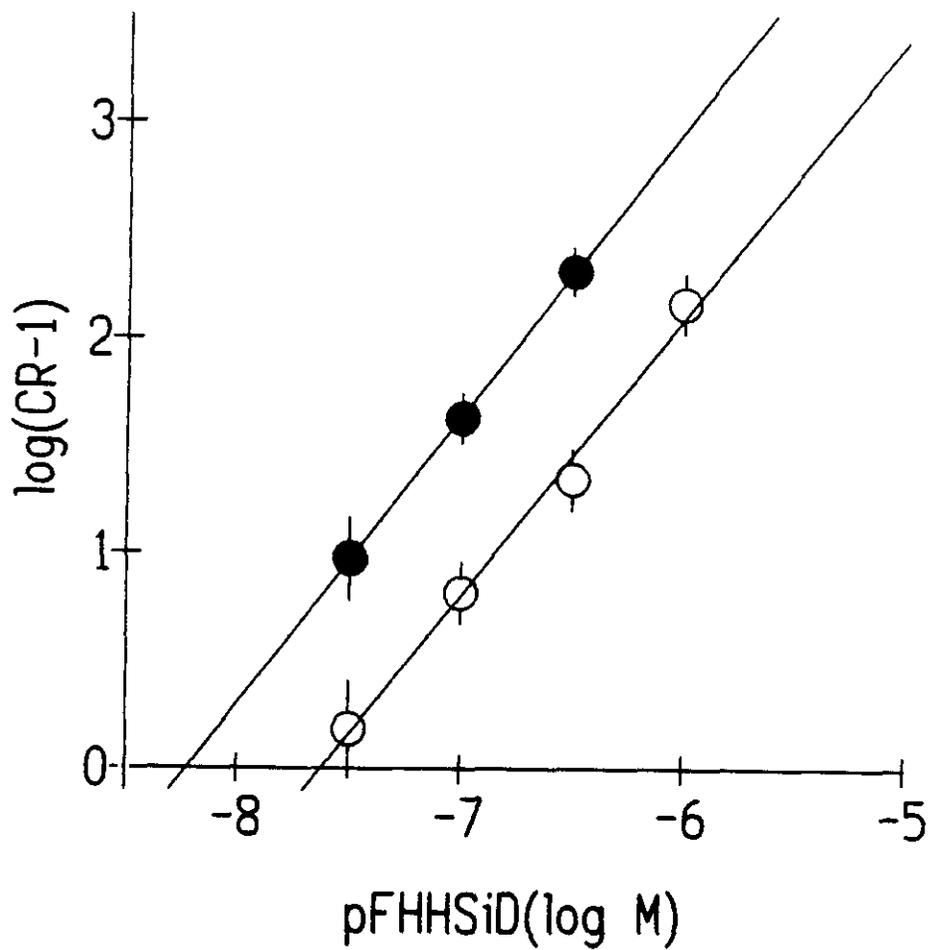


Figura 36. Análisis de regresión de Schild para el antagonismo del pFHHSiD sobre el efecto contráctil de la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero con endotelio (○) y sin endotelio (●). Los puntos representan la media \pm E.S.M. de 7 vasos.

Tabla 5. Potencia de los antagonistas muscarínicos en arterias coronarias de resistencia aisladas del ventrículo izquierdo del cordero con endotelio intacto (+ E) o desprovistas de endotelio (-E). Los antagonistas son evaluados por su capacidad de inhibir la contracción a la ACh.

	n	pA ₂	pK _B	Pendiente	l ₁ μm
+ E					
Atropina	3	9.43±0.17	9.46±0.09	1.06±0.18	212±40
Pirenzepina	8	6.58±0.04	—————	2.9±0.8 *	320±28
AFDX 116	6	6.04±0.25	6.15±0.10	1.12±0.25	273±40
4-DAMP	6	9.11±0.15	9.01±0.08	0.91±0.18	295±25
HHSiD	4	8.04±0.20	8.36±0.06	1.30±0.16	329±30
pFHHSiD	7	7.56±0.08	7.85±0.05	1.33±0.19	382±24
-E					
Pirenzepina	13	7.49±0.15	7.51±0.06	1.02±0.12	361±22
AFDX 116	6	6.14±0.16	6.18±0.05	1.03±0.14	291±34
pFHHSiD	6	8.24±0.19	8.65±0.08	1.33±0.20	300±50

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos, donde n indica el número de vasos. El pA₂ es la intersección con la abcisa de la línea de regresión en la representación de Schild. El pK_B es el logaritmo negativo de la constante de disociación, cuando el complejo antagonista-receptor está en equilibrio. Este valor se ha calculado a partir de la representación de Schild con la pendiente ajustada a la unidad. *: Pendientes de la representación de Schild significativamente diferente de la unidad (P < 0.05). l₁ es el diámetro de la luz de los segmentos arteriales intramiocárdicos.

4.6 Caracterización del receptor muscarínico relajante

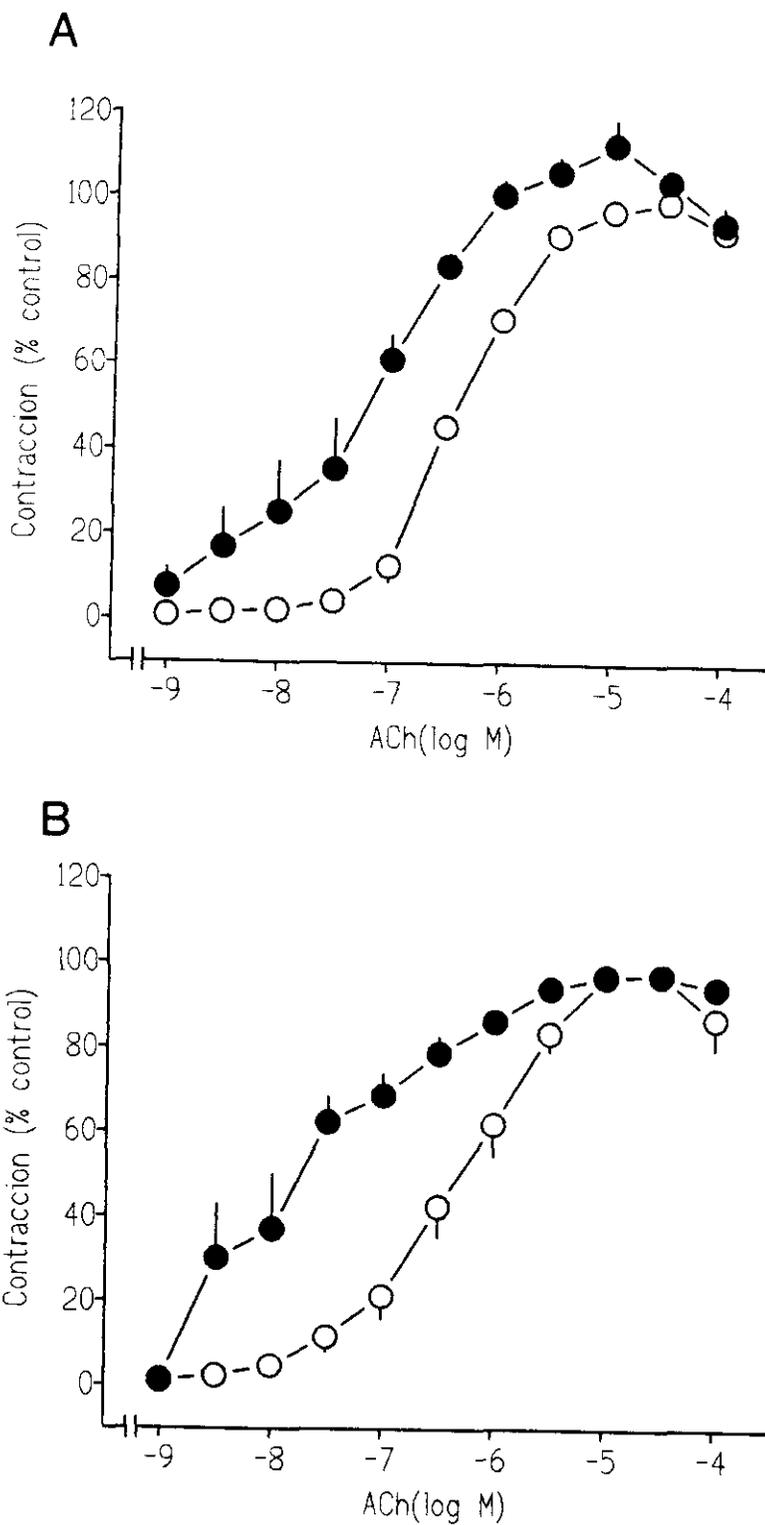


Figura 37. Efecto potenciador de (A) la pirencepina (10^{-9} M) y (B) la telencepina (10^{-9} M) sobre la curvas concentración-respuesta de la ACh en las arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) control y (●) en presencia del antagonista selectivo para los receptores M_1 . Los símbolos representan la media \pm E.S.M de 6 experimentos.

Tabla 6. Efecto potenciador de bajas concentraciones de pirenzepina (10^{-9} - 10^{-7} M) sobre las curvas concentración respuesta a la ACh en vasos con endotelio intacto (+E), pero no en arterias coronarias de resistencia del cordero desprovistas de endotelio (-E).

Pirenzepina	n	pD ₂ con antagonista		ΔpD ₂
		Control	Antagonista	
A. +E				
10 ⁻⁹ M	6	6.29±0.09	7.30±0.25*	1.01±0.21
10 ⁻⁸ M	6	6.16±0.20	6.69±0.20*	0.53±0.11
10 ⁻⁷ M	6	6.22±0.15	8.18±0.60*	1.96±0.52
B. -E				
10 ⁻⁹ M	4	6.58±0.16	6.37±0.13	-0.21±0.08
10 ⁻⁷ M	5	6.93±0.19	6.30±0.12*	-0.63±0.22

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. pD₂ es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50, concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo, mientras que ΔpD₂ es la diferencia entre una primera curva control y una segunda curva en la presencia del antagonista. *: P < 0.05, comparado con la curva control (t-test pareado).

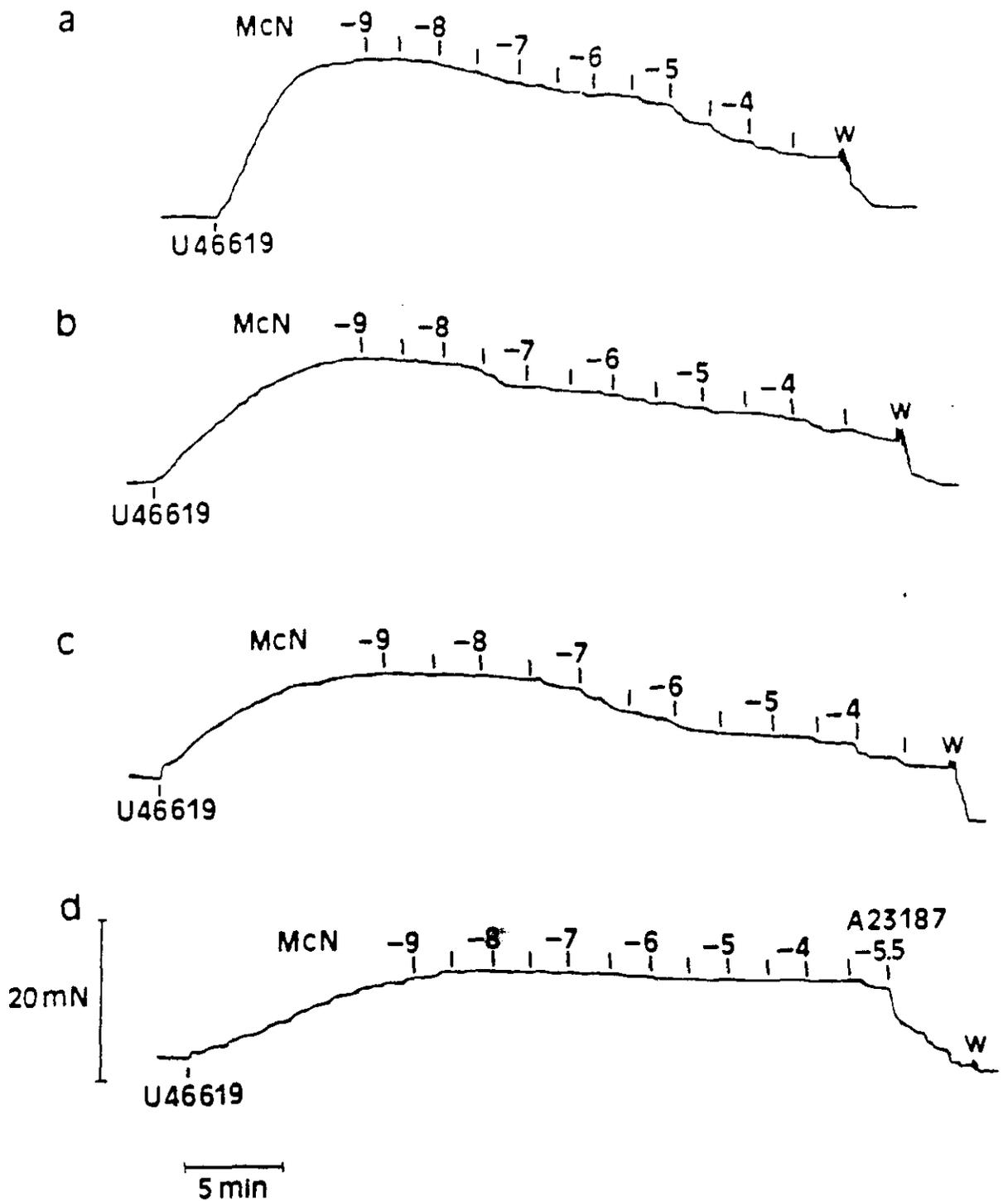


Figura 38. Registros isométricos que muestran el efecto relajante del agonista putativo-M₂, McN-A-343 en una arteria coronaria de resistencia del cordero (a) en condiciones control y en presencia de (b) AFDX-116 (3×10^{-7} M) (c) pFHHSiD (10^{-7} M) y (d) pirencepina (10^{-9} M). La escala vertical muestra la fuerza en mN y la horizontal el tiempo en minutos.

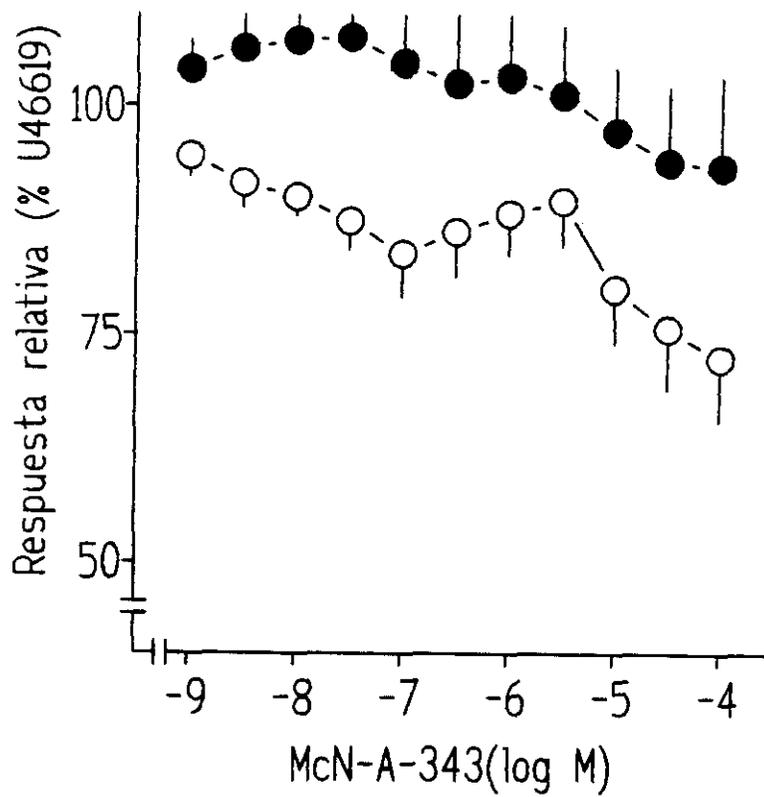


Figura 39. Curvas concentración-respuesta al agonista putativo M_1 , McN-A-343, en arterias coronarias de resistencia del cordero con endotelio intacto, precontraídas con U46619, en condiciones control (O) y en presencia de pirenzepina ($10^{-9}M$) (●). Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5-16 vasos.

Tabla 7. Resumen del estudio comparativo de los receptores muscarínicos relajantes en arterias de resistencia de ratas Wistar. Potencia de los antagonistas muscarínicos en arterias coronarias y mesentéricas. Los antagonistas fueron evaluados por su capacidad de inhibir la relajación a la ACh en los segmentos vasculares.

	n	pA ₂	pK _B	Pendiente	l ₁ μ m
A. Arterias mesentéricas.					
Pirincepina	6	7.48±0.36	7.27±0.15	0.64±0.30	224±23
AFDX 116	4	6.36±0.32	6.31±0.11	0.94±0.28	253±14
pFHHSiD	10	8.05±0.30	8.51±0.14	1.43±0.36	252±12
Tropicamida	6	6.06±0.20	6.06±0.15	0.98±0.50	267±17
B. Arterias coronarias.					
Pirincepina	8	8.61±0.21	8.60±0.25	1.20±0.60	265±36
AFDX 116	7	5.72±0.16	5.79±0.15	1.25±0.50	321±30
HHSiD	6	8.65±0.48	8.42±0.12	0.81±0.28	199±21

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos. El pA₂ es el valor de intersección con la abcisa de la línea de regresión en la representación de Schild. El pK_B es el logaritmo negativo del constante de disociación cuando el complejo antagonista-receptor está en equilibrio. Este valor se ha calculado a partir de la representación de Schild con la pendiente ajustada a la unidad.

l₁ es el diámetro de la luz de los segmentos arteriales.

4.7 Caracterización de la respuesta mediada por receptores nicotínicos

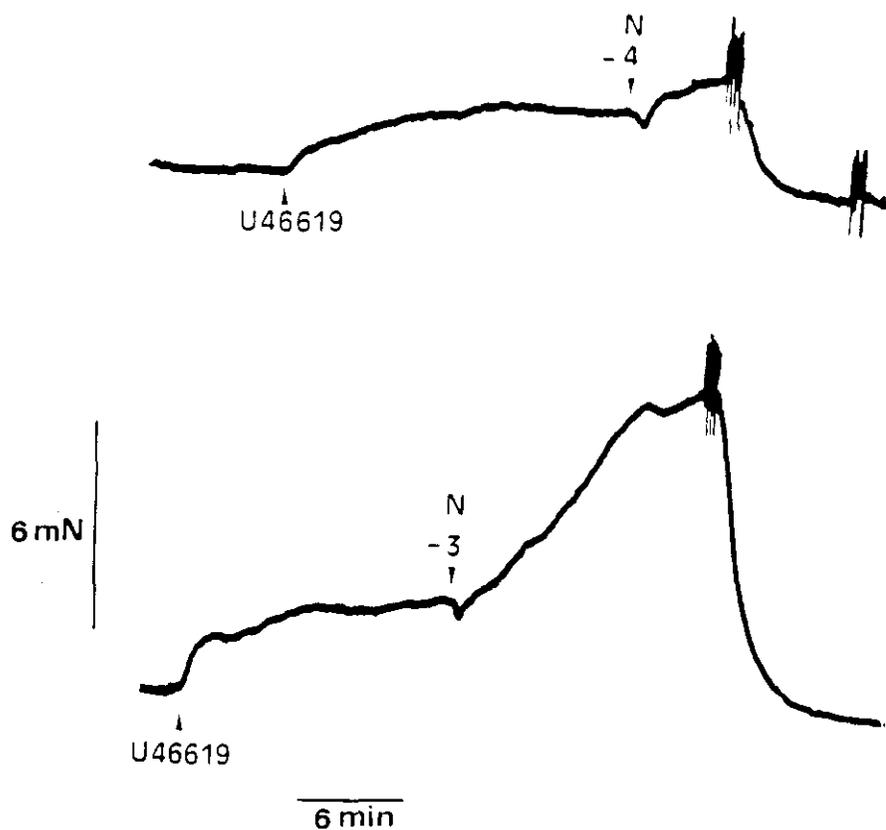


Figura 40. Registros isométricos que muestran el efecto de la nicotina en una arteria coronaria de resistencia del cordero precontraída con U46619. La escala vertical indica la fuerza en mN y la horizontal el tiempo en minutos.

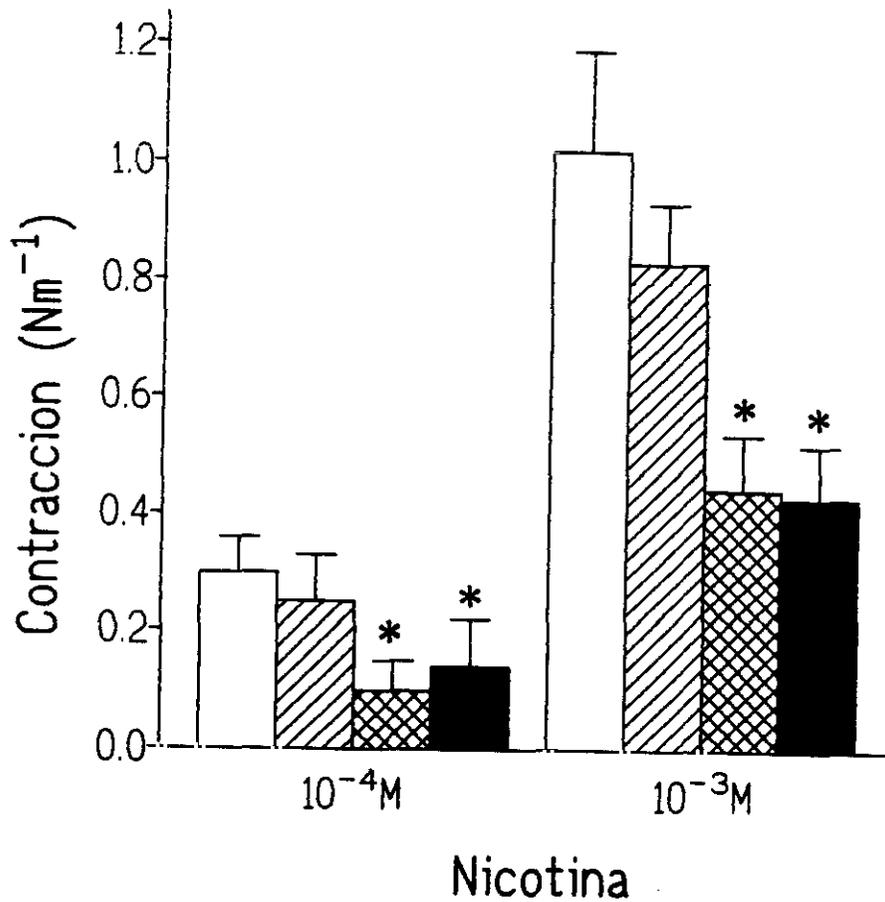


Figura 41. Incremento en la respuesta contráctil a la nicotina en arterias coronarias de resistencia del cordero precontraídas con U46619. Respuesta control (□) y el efecto de la fisostigmina (10⁻⁶M) (▨), la atropina (10⁻⁶M) (▩) y el hexametonio (10⁻⁵M) (■) sobre el efecto contráctil. Las barras indican la media ± E.S.M. de 8-12 experimentos. * P < 0.05 comparado con respuesta control.

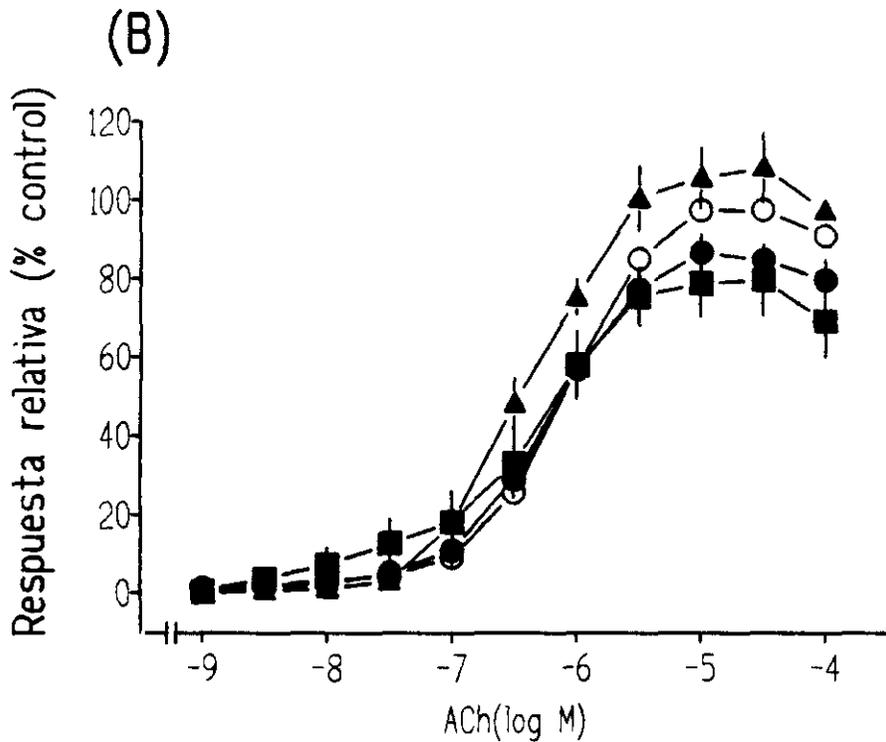
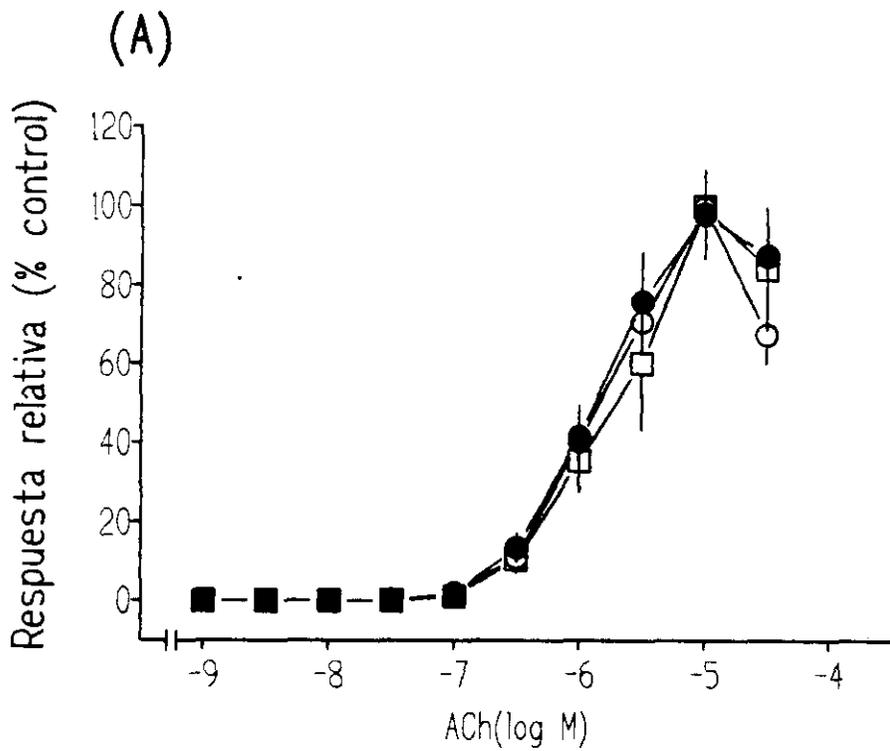


Figura 42. Efecto del hexametonio sobre las curvas concentración-respuesta a la ACh en (A) segmentos proximales de la LDA y (B) arterias coronarias de resistencia del cordero. (□, ○) Controles (●) hexametonio 10^{-4} M, (■) hexametonio 10^{-5} M, (▲) hexametonio 10^{-6} M. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6-12 experimentos.

Tabla 8. Efecto del antagonista de los receptores nicotínicos ganglionares, hexametonio, sobre la respuesta a la ACh en segmentos proximales de la LDA sin (A) o con (B) miocardio y ramas de tercer a cuarto orden de la arteria coronaria izquierda descendente sin miocardio adherido (C).

	n	pD ₂	ΔpD ₂	E _{max}	ΔE _{max}
A. Sin miocardio.					
Control 1	12	5.82±0.08	—————	2.6±0.7	—————
Control 2	4	5.78±0.11	0.11±0.14	1.4±0.4	0.02±0.09
Hexamet. 10 ⁻⁴ M	8	5.83±0.06	0.04±0.12	2.8±0.8	0.4 ±0.2
B. Con miocardio					
Control	6	5.85±0.04	—————	5.0±1.5	—————
Hexamet. 10 ⁻⁴ M	6	5.26±0.13	0.58±0.15*	1.9±0.3	3.0±0.9*
C. Arterias de resistencia.					
Control	12	6.09±0.05	—————	2.0±0.3	—————
Hexamet. 10 ⁻⁶ M	6	6.06±0.10	0.02±0.09	1.8±0.2	0.33±0.18
10 ⁻⁵ M	6	6.40±0.18	0.32±0.20	1.5±0.2	0.56±0.31
10 ⁻⁴ M	6	6.44±0.13	0.34±0.10*	2.0±0.5	0.07±0.11

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. Control 1 es la primera curva concentración-respuesta a la ACh, mientras el control 2 es la segunda curva sin antagonista y realizado en paralelo en presencia de hexametonio. pD₂ es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50 del agonista que origina el 50% del efecto máximo (E_{max}), mientras ΔpD₂ y ΔE_{max} son las diferencias entre una primera curva control y una segunda curva en presencia del tratamiento. *: P < 0.05, comparado con la curva control (t-test pareado).

4.8 Modulación endotelial de la respuesta a la ACh

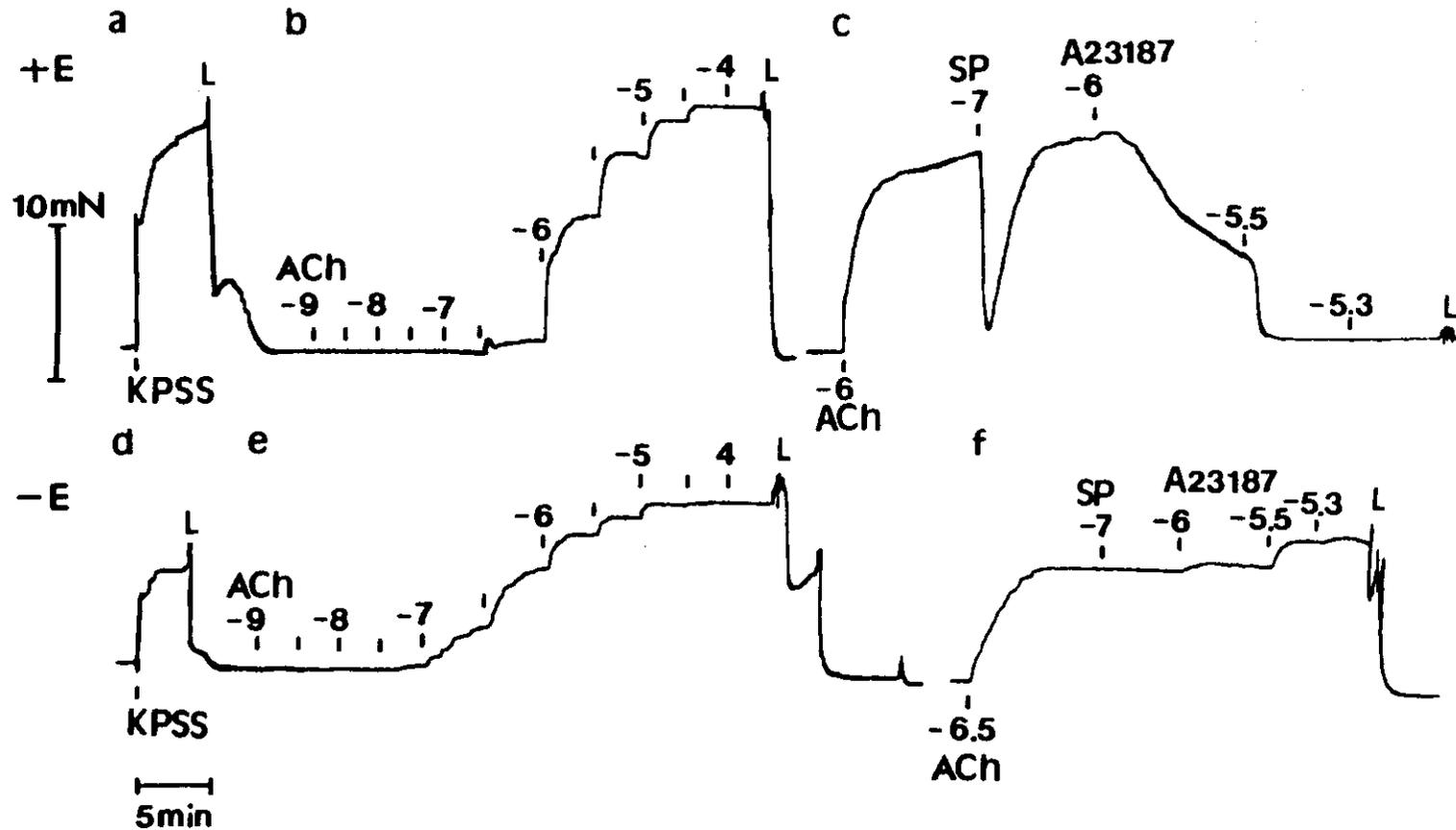


Figura 43. Registros isométricos que muestran la respuesta contráctil a la ACh de una arteria coronaria de resistencia de 248 μm (a-c) en presencia de endotelio y (d-f) después de la retirada mecánica del endotelio. Respuestas a la estimulación con (a,d) una solución rica en K^+ (K-PSS), (b,e) concentraciones crecientes de ACh y (c,f) sustancia P (SP) y el ionóforo del calcio A23187. L: Lavado. La escala vertical muestra la fuerza (mN) y la horizontal el tiempo (minutos).

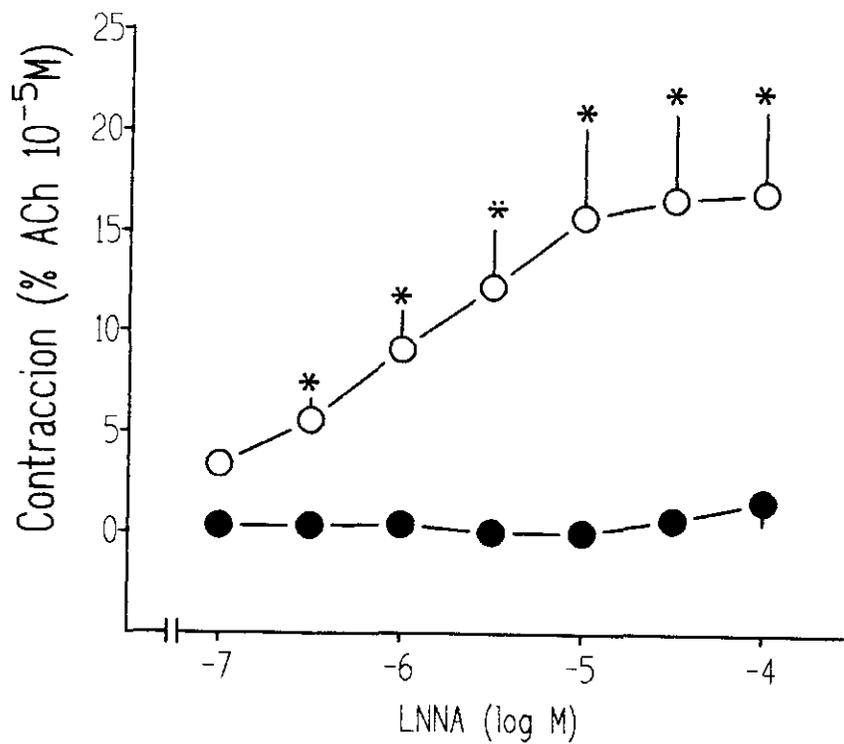


Figura 44. Efecto de concentraciones crecientes de N^G-nitro-L-arginina (LNNA) sobre la tensión basal de las arterias coronarias de resistencia del cordero con endotelio intacto (○) y sin endotelio (●). Los símbolos representan la media ± E.S.M de 6 vasos. * P < 0.05.

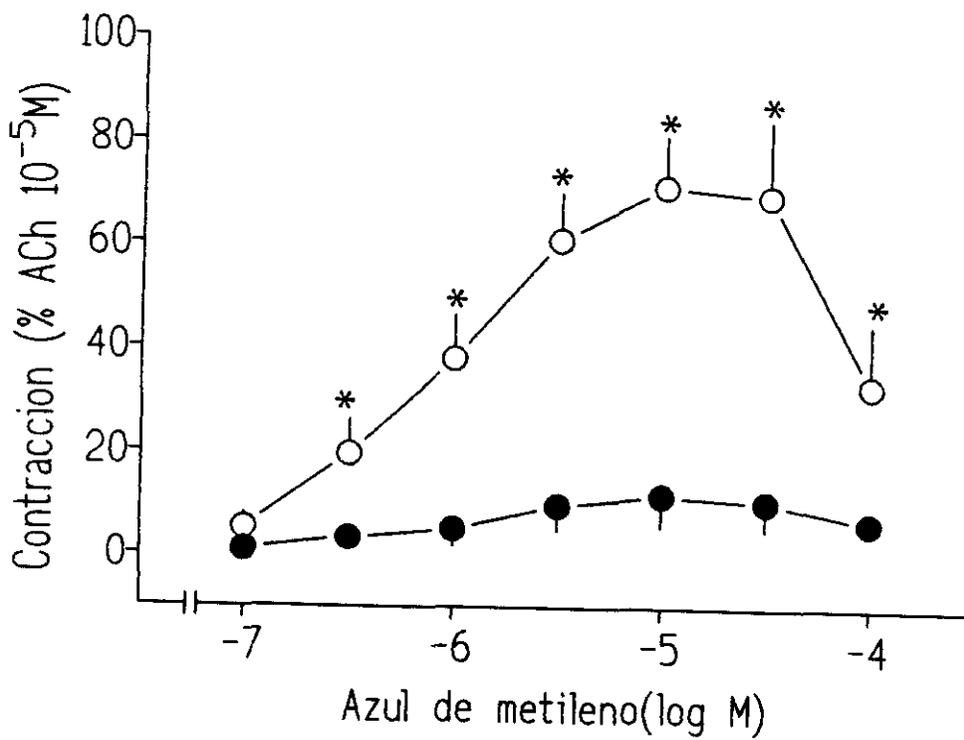


Figura 45. Efecto de concentraciones crecientes de azul de metileno sobre la tensión basal de las arterias coronarias de resistencia del cordero (○) con endotelio intacto y (●) sin endotelio. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6 experimentos. * $P < 0.05$.

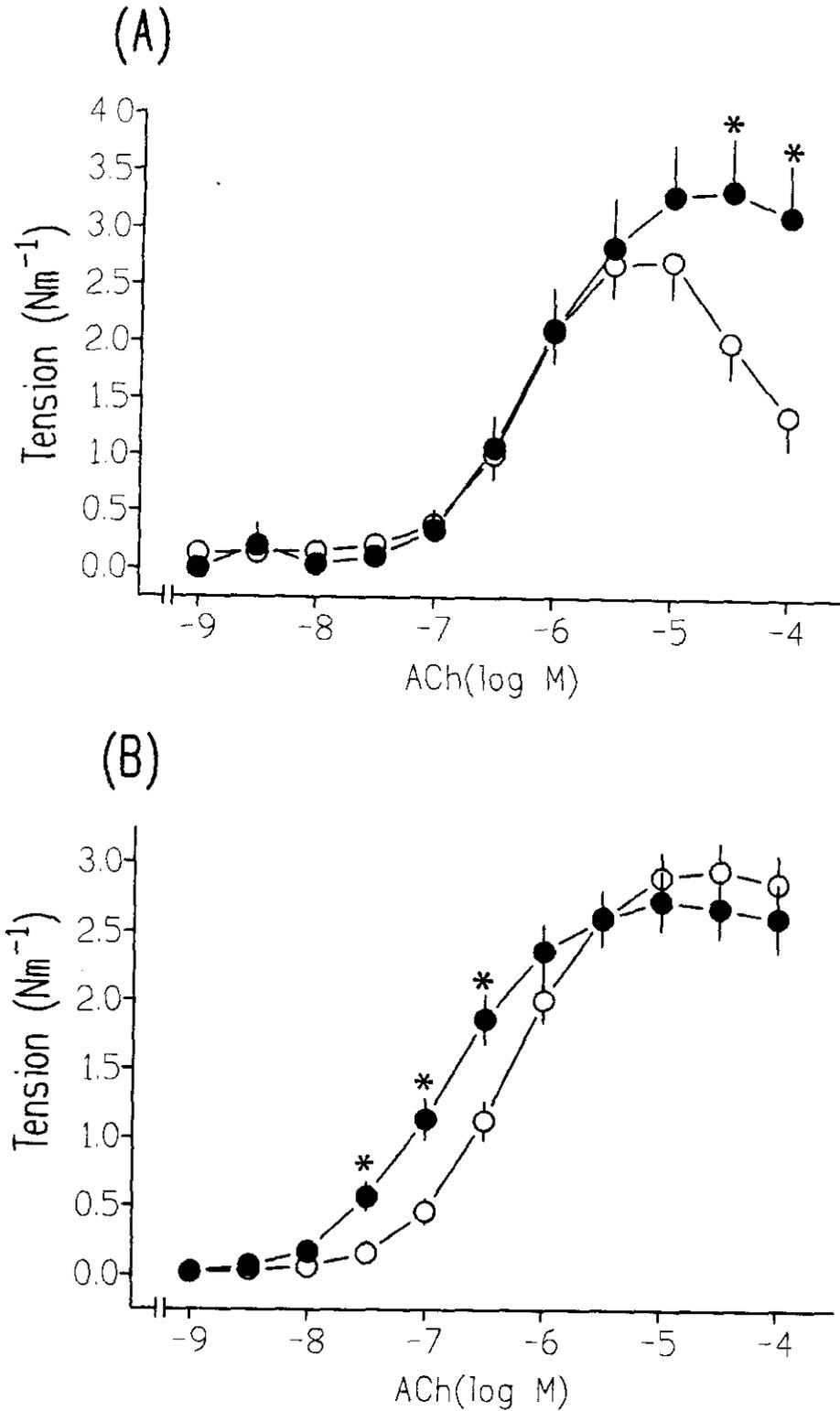


Figura 46. Curvas concentración-respuesta a la ACh en (A) segmentos proximales de la LDA y (B) arterias coronarias de resistencia del cordero (○) con endotelio intacto y (●) desprovistas de endotelio. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 10-12 experimentos. * $P < 0.05$.

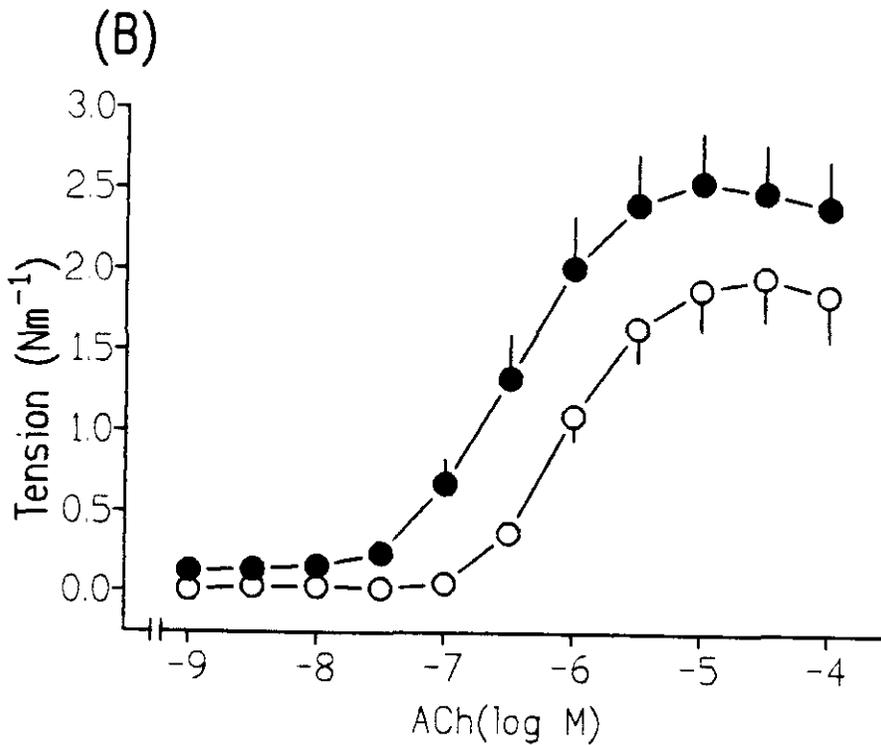
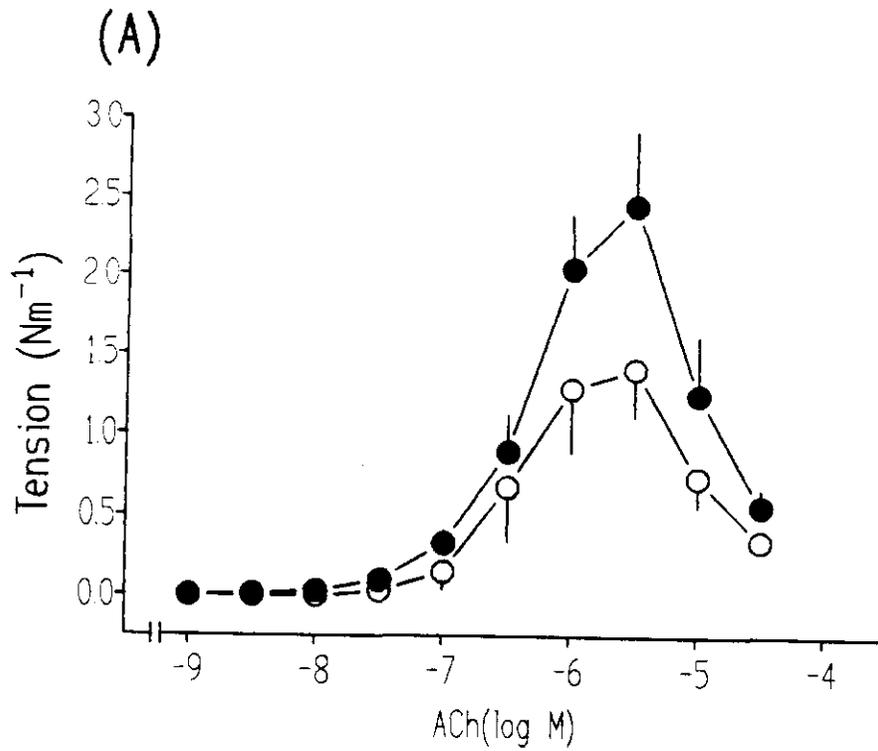


Figura 47. Efecto de la inhibición de la NO sintasa con N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) sobre la respuesta contráctil a la ACh en (A) segmentos proximales de la LDA y (B) arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) Controles (●) En presencia de L-NNA (10⁻⁴M). Los símbolos representan la media ± E.S.M. de 6-9 experimentos.

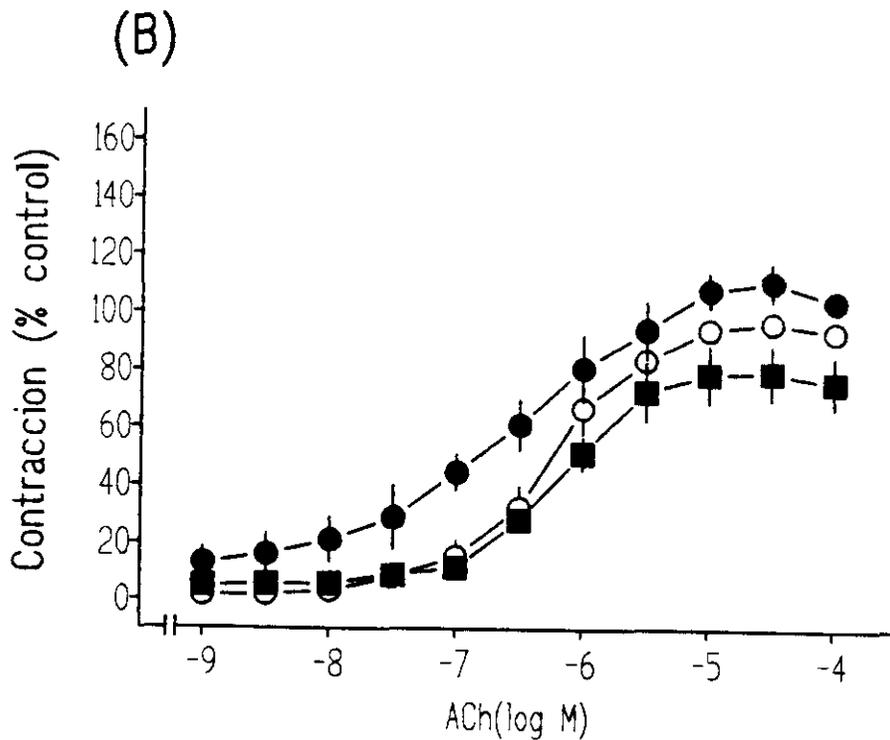
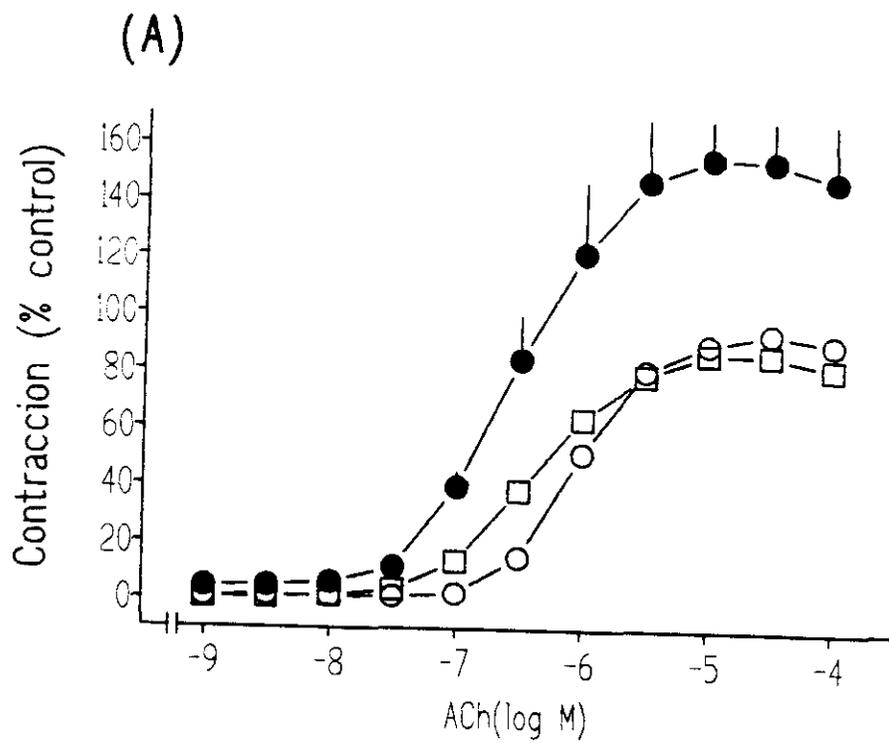


Figura 48. Efecto de la inhibición de la NO sintasa sobre la respuesta contráctil a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) en ausencia y (B) en presencia de fisostigmina $10^{-6}M$. (A) Curvas concentración-respuesta a la ACh en condiciones control (○), en presencia de LNNA $10^{-5}M$ (●) y reversión del bloqueo de la NO sintasa con L-arginina $10^{-3}M$ (□). (B) Curvas concentración-respuesta a la ACh en presencia de fisostigmina $10^{-6}M$ (○), de fisostigmina $10^{-6}M$ y LNNA $10^{-5}M$ (●) y de fisostigmina $10^{-6}M$ y L-NNA $10^{-4}M$ (■). Los símbolos representan la media \pm E.S.M de 4-6 experimentos.

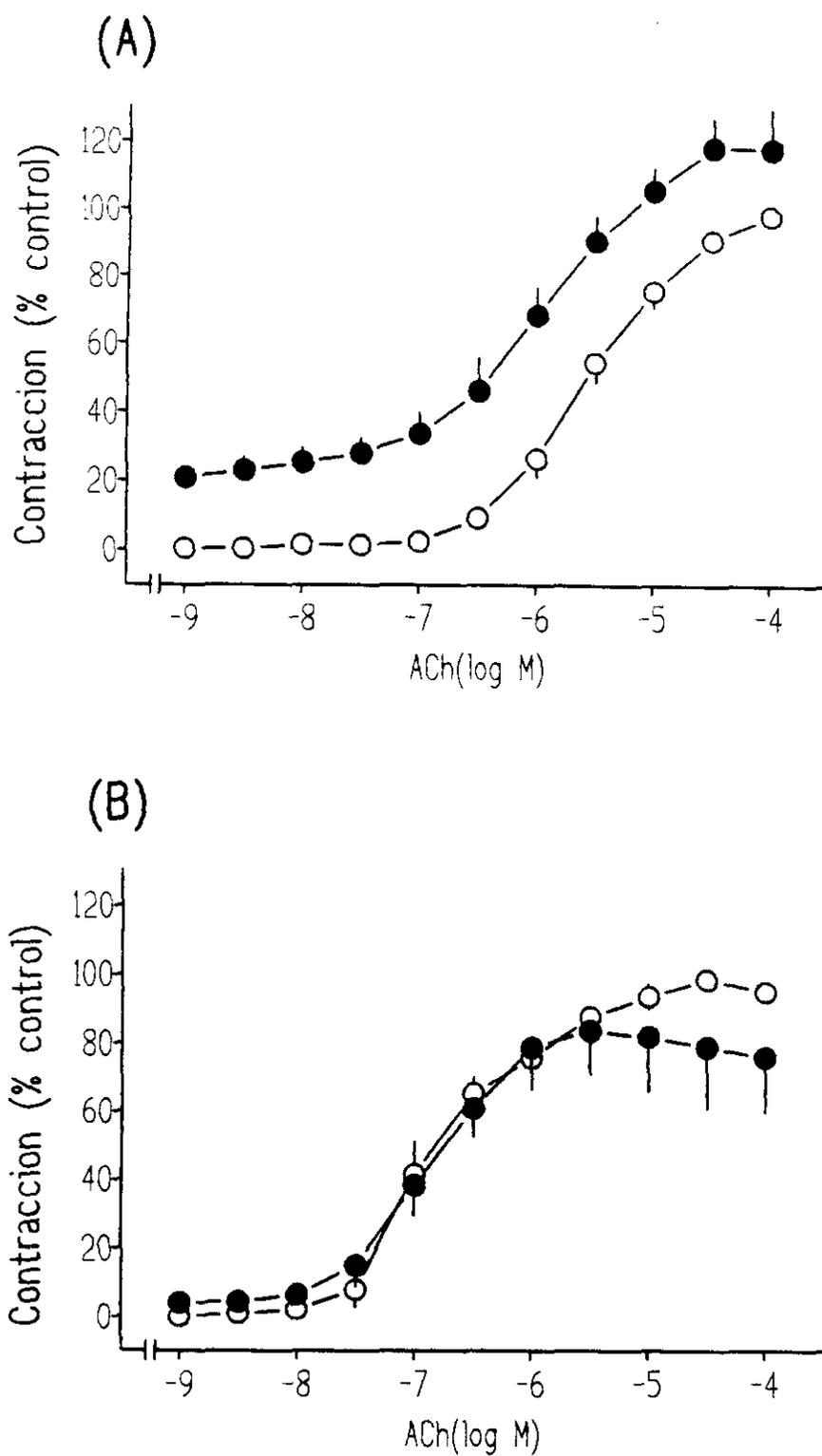


Figura 49. Efecto de la oxihemoglobina $10^{-5}M$ (●) sobre la respuesta contráctil a la ACh (○) en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) en ausencia y (B) en presencia de fisostigmina $10^{-6}M$. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 4-8 experimentos.

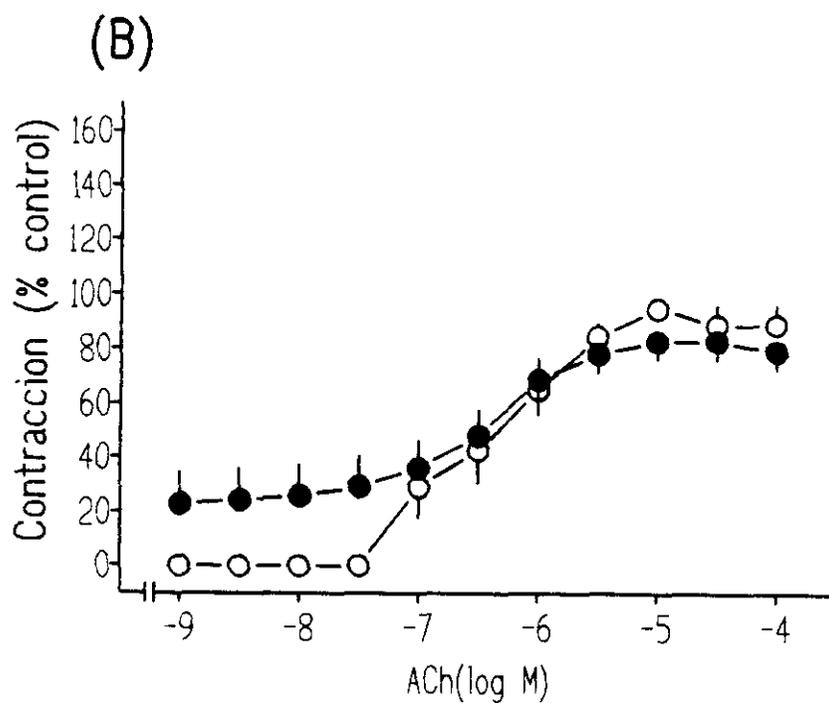
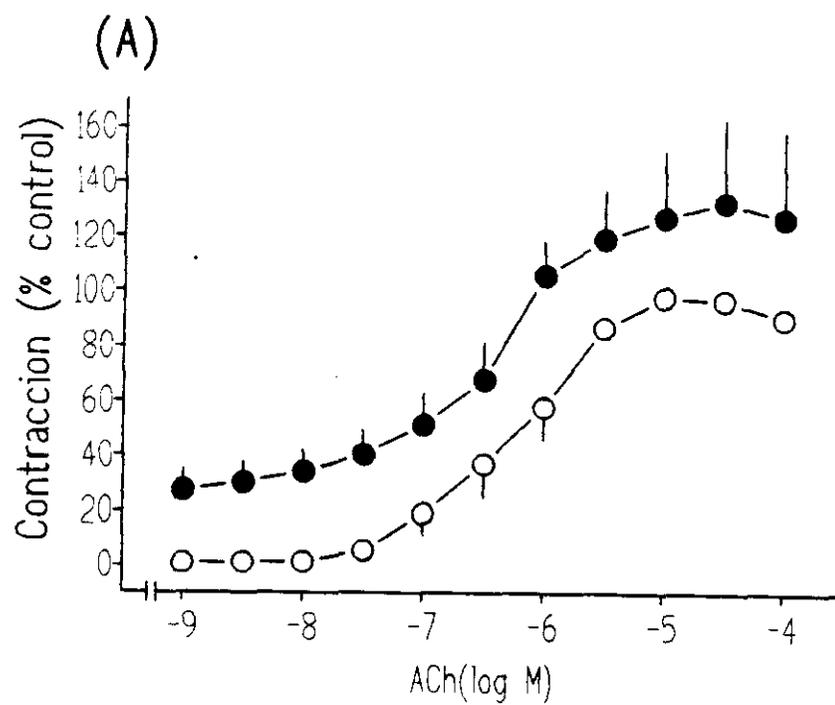


Figura 50. Efecto del azul de metileno $10^{-6}M$ (●) sobre las curvas concentración-respuesta a la ACh (○) en arterias coronarias de resistencia del cordero (A) en ausencia y (B) en presencia de fisostigmina $10^{-6}M$. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 4-7 experimentos.

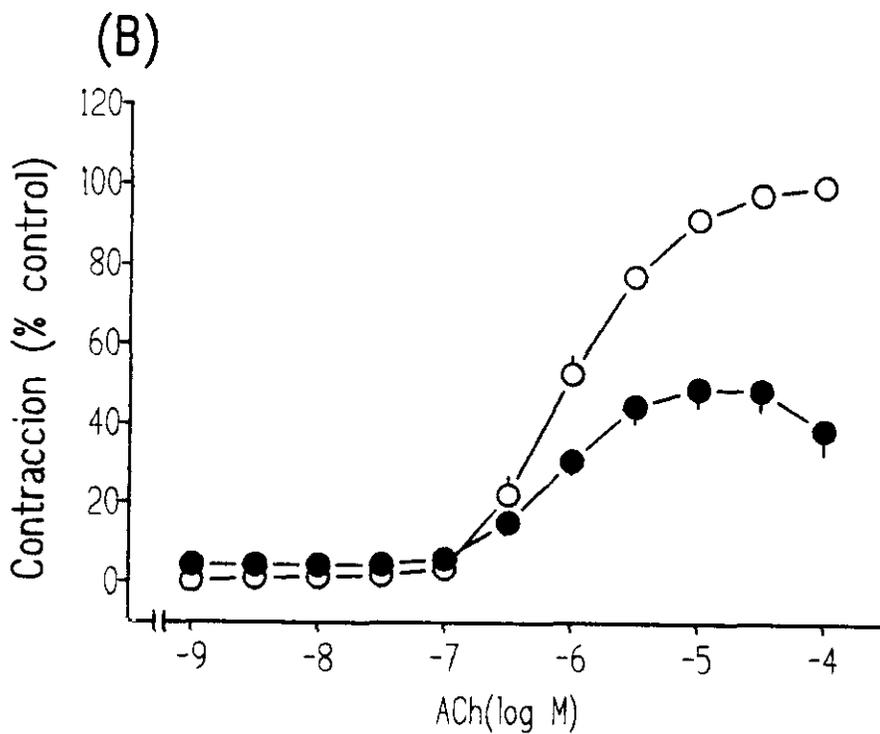
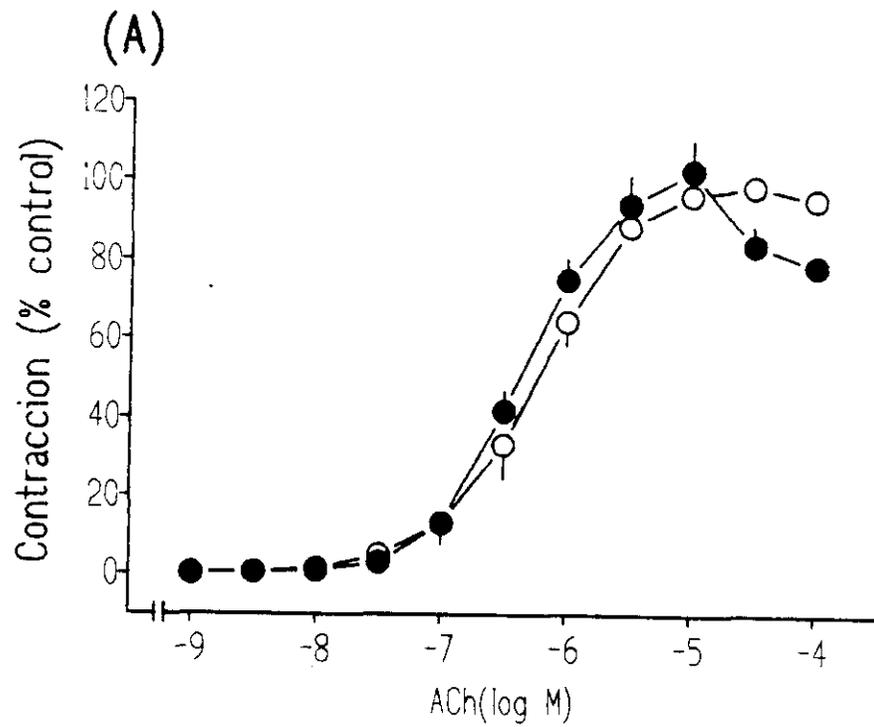


Figura 51. Efecto de (A) la indometacina y (B) del ácido nordihidroguarético (NDGA) sobre la respuesta contráctil a la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) (○) Controles (●) Indometacina 10^{-5} M. (B) (○) Controles (●) NDGA $5 \mu\text{M}$. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 4-8 preparaciones.

Tabla 9. Efectos de la N^G-nitro-L-arginina (LNNA) (y su reversión con L-arginina, L-ARG, 10⁻³M), la oxihemoglobina (Hb, 10⁻⁵M), el azul de metileno (MB, 10⁻⁶M), la indometacina (10⁻⁵M) y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA, 5x10⁻⁶M) sobre las curvas concentración-respuesta a la ACh en ausencia (A -) o presencia (B +) de fisostigmina (10⁻⁶M) en arterias coronarias de resistencia del cordero.

	n	pD ₂	ΔpD ₂	E _{max} Nm ⁻¹	ΔE _{max} Nm ⁻¹
A. - fisostigmina.					
Control	37	6.02 ± 0.07	—————	2.2 ± 0.2	—————
LNNA 10 ⁻⁵ M	10	6.55 ± 0.07	0.52 ± 0.07*	2.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2*
+ L-ARG	6	6.34 ± 0.10	0.24 ± 0.06+	2.5 ± 0.5	0.3 ± 0.1*
Hb	8	6.13 ± 0.14	0.60 ± 0.12*	2.5 ± 0.5	0.5 ± 0.2*
MB	7	6.67 ± 0.15	0.39 ± 0.09*	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.3
Indometacina	8	6.39 ± 0.06	0.09 ± 0.10	3.1 ± 0.5	0.2 ± 0.2
NDGA	4	6.11 ± 0.05	0.09 ± 0.08	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2*
B. + fisostigmina.					
Control	16	6.45 ± 0.12	—————	2.3 ± 0.3	—————
LNNA 10 ⁻⁵ M	4	6.45 ± 0.30	0.26 ± 0.39	2.7 ± 0.7	0.3 ± 0.2
LNNA 10 ⁻⁴ M	4	6.19 ± 0.06	0.15 ± 0.12	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.3
Hb	4	6.83 ± 0.10	0.01 ± 0.05	2.1 ± 0.4	0.5 ± 0.3
MB	4	6.34 ± 0.03	0.09 ± 0.28	2.4 ± 0.5	0.4 ± 0.4

Los valores se expresan como media ± E.S.M. de varios experimentos donde n indica el número de vasos examinados. pD₂ es el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50 del agonista, que origina el 50% del efecto máximo (E_{max}), mientras ΔpD₂ y ΔE_{max} son las diferencias entre una primera y segunda curva en ausencia y presencia del tratamiento. *: P < 0.05, comparado con la curva control para cada tratamiento (t-test pareado). +: P < 0.05, comparado con la curva concentración-respuesta a la ACh en presencia de LNNA (10⁻⁵M) (t-test pareado).

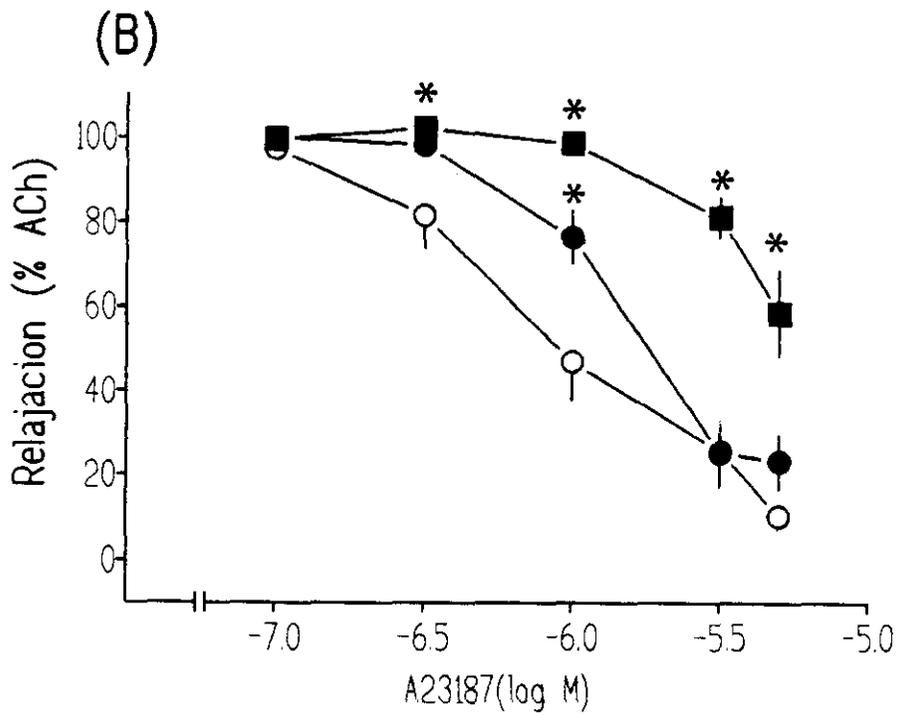
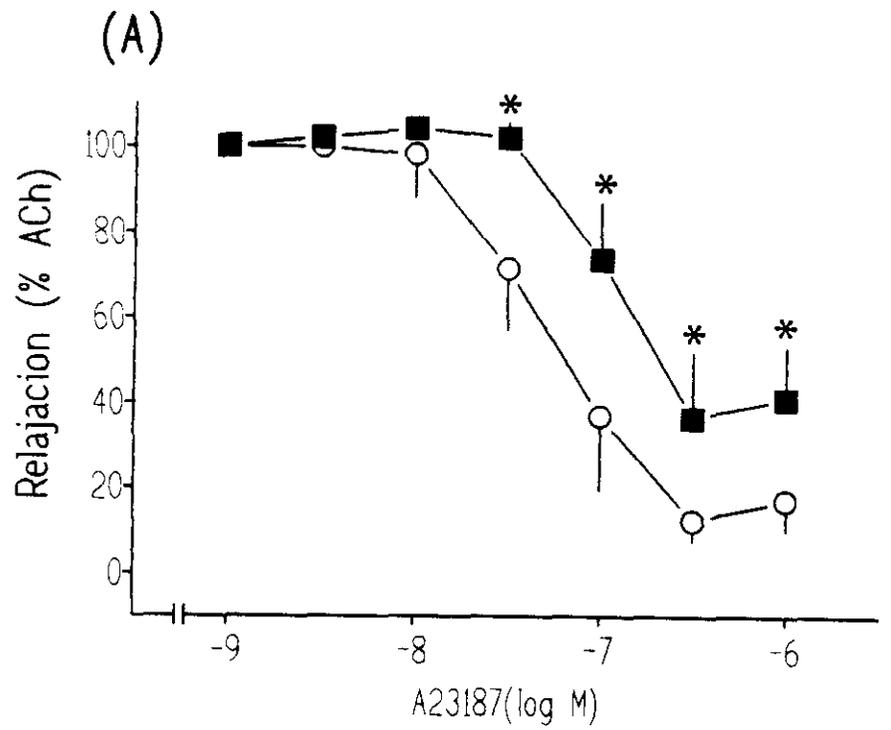


Figura 52. Efecto de la inhibición de la NO sintasa sobre la respuesta relajante al ionóforo del calcio, A23187, en (A) segmentos proximales de la LDA y (B) arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) (○) Controles (■) L-NNA 10⁻⁴M. (B) (○) Controles (●) L-NNA 10⁻⁵M (■) L-NNA 10⁻⁴M. Los símbolos representan la media ± E.S.M de 5-9 experimentos. * P < 0.05.

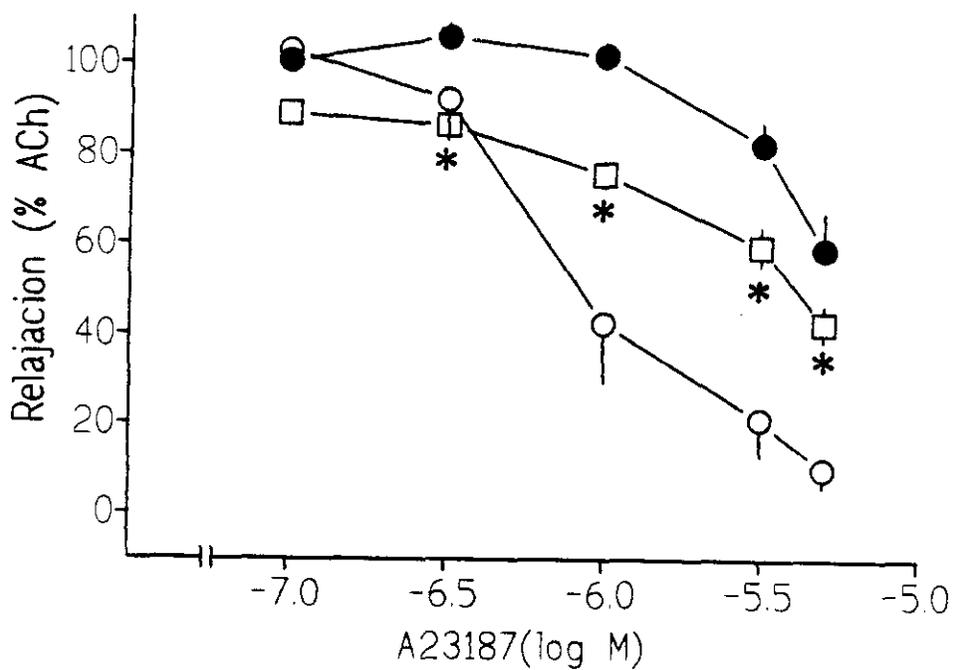


Figura 53. Efecto de la reversión parcial con L-arginina del bloqueo de la NO sintasa sobre la respuesta relajante al ionóforo del calcio, A23187, en arterias coronarias de resistencia del cordero. (○) Control, (●) en presencia de LNNA 10^{-4} M y (□) en presencia de L-NNA 10^{-4} M y L-arginina 10^{-3} M. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6 experimentos. * $P < 0.05$, comparado con la respuesta relajante en presencia de LNNA.

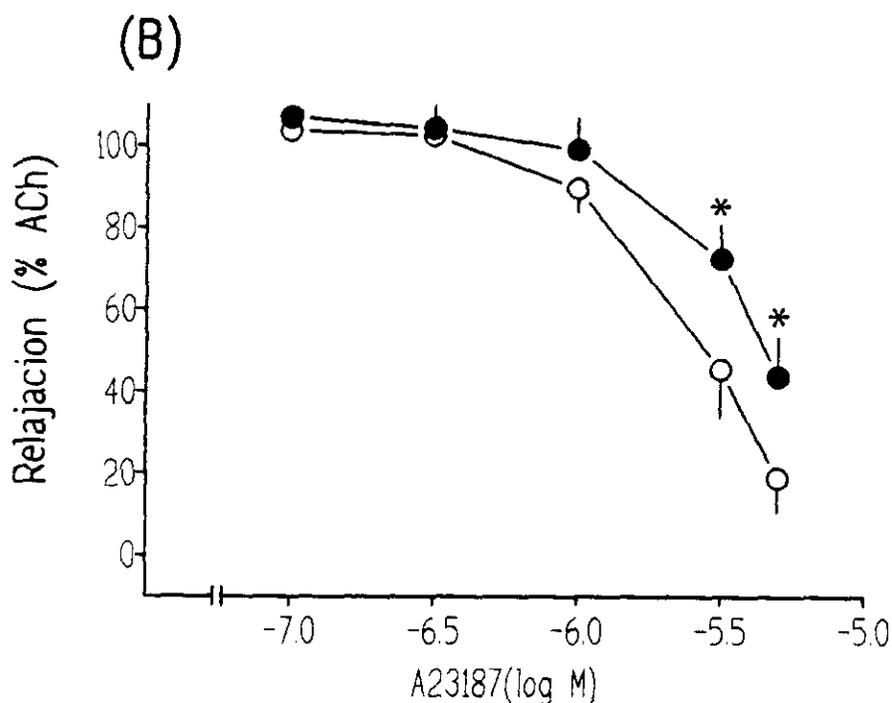
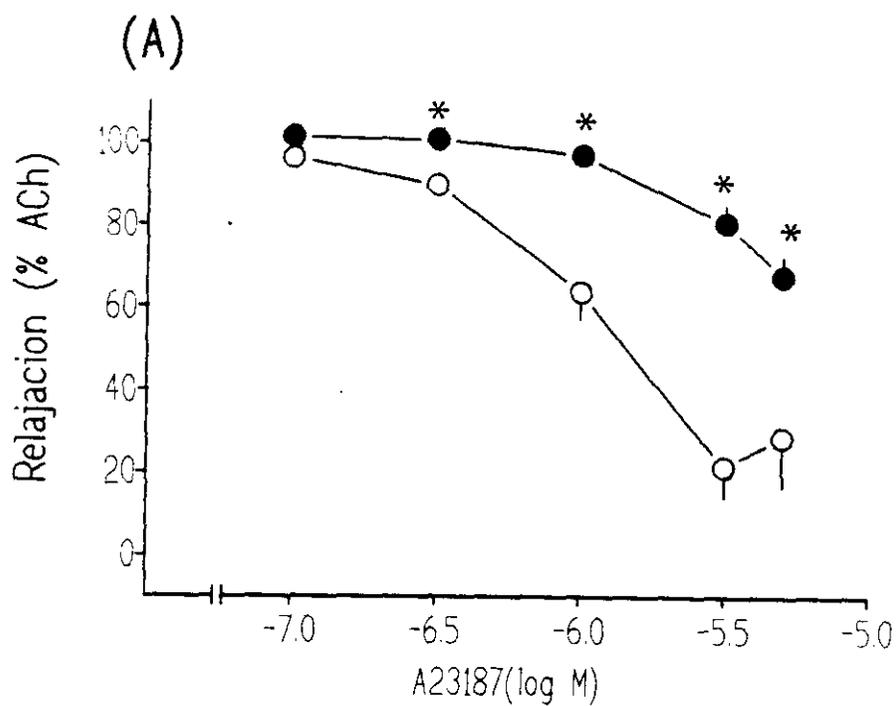


Figura 54. Efecto de (A) la oxihemoglobina y (B) el azul de metileno sobre la respuesta relajante al ionóforo del calcio, A23187, en arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) (○) Control (●) oxihemoglobina 10^{-5} M. (B) (○) Control (●) azul de metileno 10^{-6} M. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 6 experimentos. * $P < 0.05$ comparado con la respuesta control.

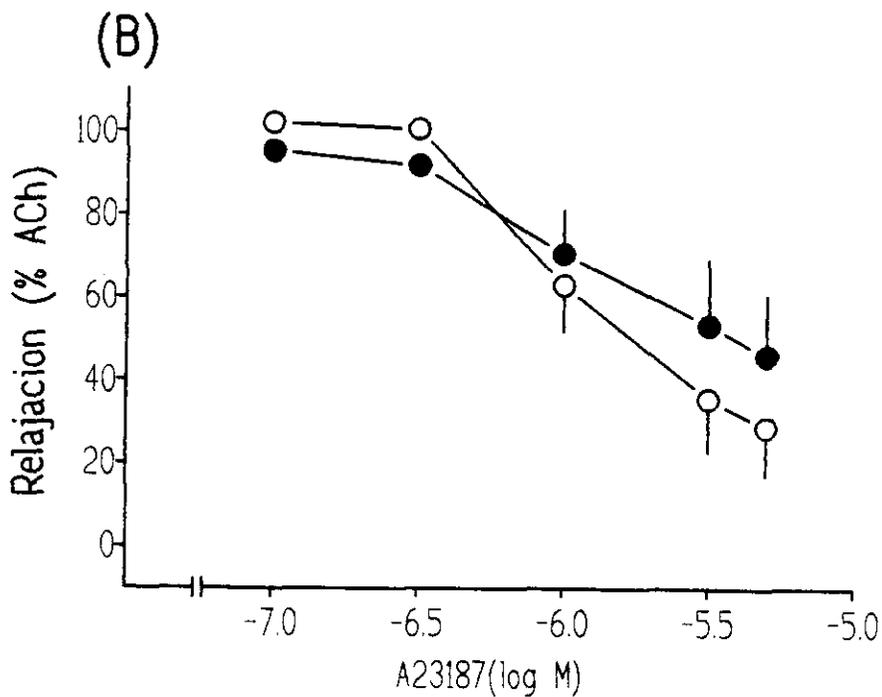
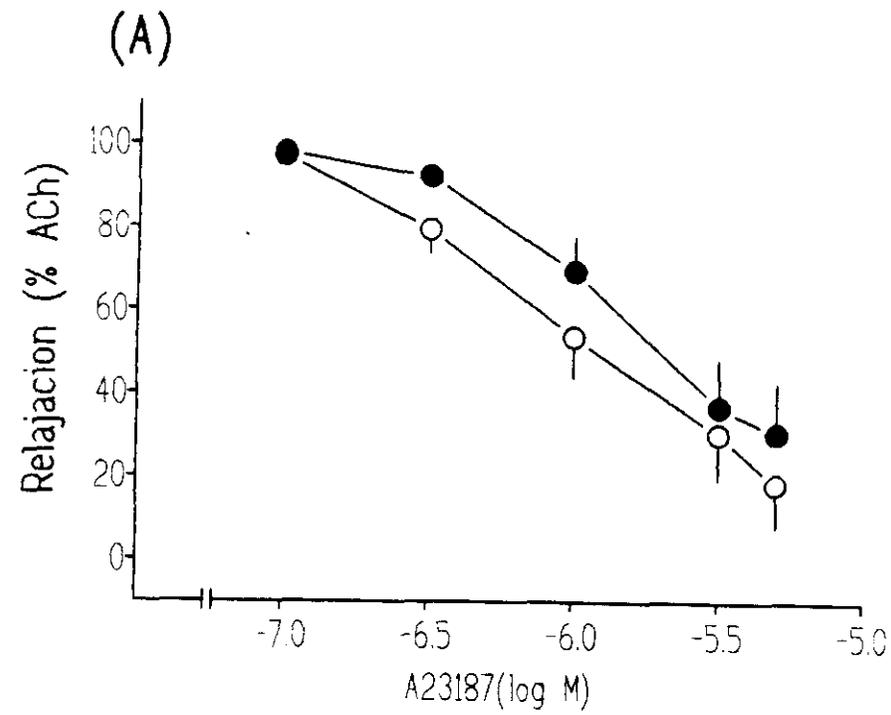


Figura 55. Efecto de (A) la indometacina y (B) el NDGA sobre la respuesta relajante al ionóforo del calcio, A23187, en arterias coronarias de resistencia del cordero. (A) (○) Control (●) indometacina 10⁻⁵M. (B) (○) Control (●) NDGA 5 μM. Los símbolos representan la media ± E.S.M de 4-8 experimentos.

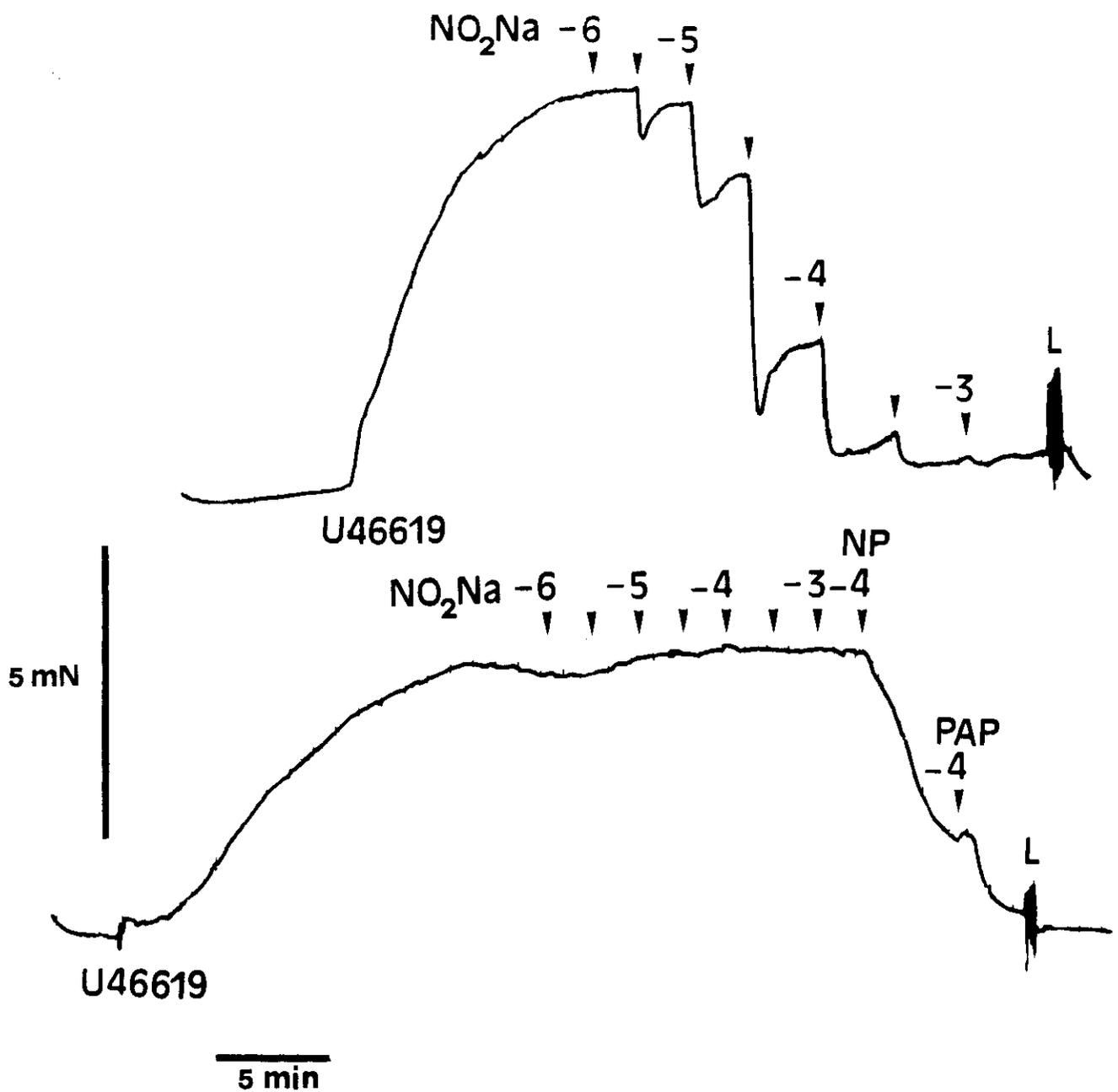


Figura 56. Registros isométricos que muestran la relajación al NO exógeno (NaNO₂ acidificado) de una arteria coronaria de resistencia del cordero precontraída con ACh y después de la incubación con oxihemoglobina (10⁻⁵M). La escala vertical representa tensión (Nm⁻¹) y la horizontal tiempo (min).

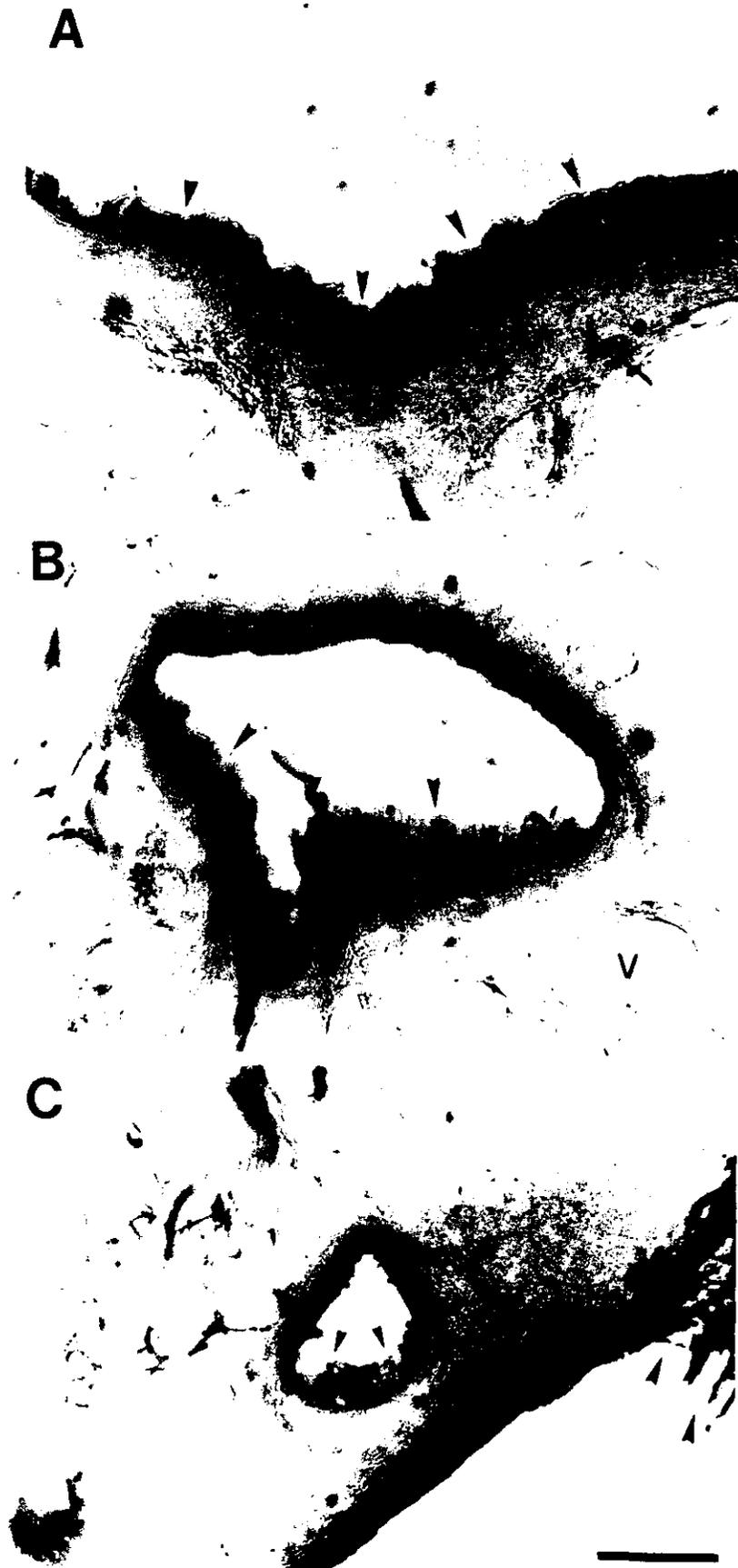


Figura 57. Localización histoquímica de la NADPH-diaforasa en la circulación coronaria del cordero. (A) Segmento proximal del arteria coronaria izquierda descendente (B) Arteria coronaria de resistencia. (C) Pequeña ramificación en la pared de una arteria coronaria grande. Las flechas indican los lugares de reacción en las células endoteliales. V, vena. Barra: 100 μ m.

5. DISCUSION

5.1 Consideraciones metodológicas y características morfológicas y funcionales de las arterias coronarias del cordero

Uno de los fines principales del presente estudio ha sido investigar si la circulación coronaria recibe una inervación colinérgica, para lo cual se ha aplicado una técnica microvascular nueva que permite medir las respuestas funcionales en segmentos de arterias de resistencia in vitro. La ventaja del estudio de los segmentos arteriales in vitro en comparación con la situación in vivo, es que se evita la influencia de cambios en la presión de perfusión, presión extravascular del miocardio y metabolismo del corazón sobre la circulación coronaria. Sin embargo, este tipo de técnicas presentan el inconveniente de que impiden obtener información de la influencia de estos factores, siendo considerado el metabolismo del corazón uno de los factores más importantes en la regulación del flujo sanguíneo coronario (BERNE y RUBIO, 1979). Además, una investigación in vivo proporciona más información integral sobre la regulación del flujo sanguíneo, pero debido a inconvenientes técnicos es difícil distinguir las diferencias regionales en las respuestas a un agonista endógeno o a una sustancia infundida. Por ello, la mayoría de los estudios que han revelado estas diferencias en la circulación coronaria se han llevado a cabo in vitro (ZUBERBUHLER y BOHR, 1965; NYBORG y col. 1991; PRIETO y col. 1991a, 1991b; SIMONSEN y col., 1992).

Los efectos de la administración de una sustancia in vivo e in vitro con frecuencia son diferentes, debido a que en estudios in vivo la sustancia llega a la pared del vaso desde el lado luminal, mientras que en estudios in vitro,

dependiendo de la técnica, se puede aplicar desde el lado extra- o intraluminal, a pesar de que habitualmente se administra la sustancia de forma que llega a los dos lados del segmento vascular al mismo tiempo. El uso de diferentes tipos de aplicación ha dado lugar a mucha controversia. Así, mediante estudios in vivo se ha sugerido que un agonista endógeno como la 5-hidroxitriptamina, sólomente producía vasodilatación de la circulación coronaria, mientras que en estudios in vitro únicamente se observó vasoconstricción (GINSBURG y col., 1980), hasta el descubrimiento de los receptores endoteliales para la 5-hidroxitriptamina (COCKS y ANGUS, 1983). Igualmente, se han descrito respuestas asimétricas a la ACh en las arterias carótida, femoral y coronaria (ANGUS y col., 1983; COHEN y col. 1984b). De estas observaciones se deduce la importancia del método de aplicación de las sustancias en las investigaciones in vitro. En el presente estudio, la administración de las sustancias se ha realizado de forma que llegaba al vaso por ambos lados, permitiendo evaluar los efectos sobre el endotelio y el músculo liso al mismo tiempo.

Nuestros estudios morfológicos han demostrado que las células musculares lisas en la arteria coronaria izquierda descendente anterior y en las arterias coronarias de resistencia de cordero tienen una orientación circular (Fig. 1). Otros autores han observado que, a diferencia de lo que ocurre en las arterias mesentéricas de resistencia, existe una capa de células musculares lisas con orientación longitudinal en las arterias coronarias de resistencia de la rata (NYBORG y col., 1987). La orientación predominantemente circular de las capas de músculo liso en las arterias coronarias de resistencia justifica el uso de segmentos vasculares en anillo en los

estudios funcionales. En estudios de las arterias coronarias pequeñas se han utilizado frecuentemente preparaciones en espiral, debido a las dificultades técnicas de montar preparaciones en anillo (MIWA y TODA, 1984), pero en las preparaciones donde con el corte en espiral se intenta orientar el músculo liso vascular en dirección longitudinal, existe el riesgo de dañar la adventicia o retirar la capa de células endoteliales. Además, el desarrollo de fuerza en este tipo de preparación depende del ángulo de corte usado para abrir y orientar la capa muscular con una orientación longitudinal (KENAKIN, 1987).

Se han desarrollado diferentes métodos para estudiar las respuestas funcionales de segmentos en anillo de arterias de resistencia *in vitro* (MULVANY y HALPERN, 1976; NILSSON y SJÖBLOM, 1985; HALPERN, 1991). Las técnicas más utilizadas han sido la medida de tensión isométrica en un miógrafo microvascular de alambres (MULVANY y NYBORG, 1980) y la medida de cambios en el diámetro de un segmento vascular suspendido en un miógrafo microvascular de presión (HALPERN, 1991), mientras que los intentos de obtener una preparación isotónica han estado limitados por la rigidez de las partes mecánicas utilizadas para controlar la fuerza isotónica (NILSSON y SJÖBLOM, 1985).

Estudios recientes en que se comparan las características del miógrafo microvascular de alambres y del de presión, han demostrado diferencias importantes. En el miógrafo de alambres, el segmento suspendido en anillo conserva la estructura circular en el estado de reposo, pero la aplicación de fuerza

induce un aplanamiento de las células musculares lisas en la parte media de la preparación, comparado con las células de las partes laterales suspendidas sobre los alambres, mientras que esta alteración no se observa en el miógrafo de presión, donde los vectores de fuerza, al igual que en la situación in vivo, están distribuidos de forma homogénea (Fig. 2).

En segmentos vasculares de la circulación mesentérica, se ha observado una reducción en el plano axial del segmento comparado con la situación in vivo. En el miógrafo de alambres no es posible corregir este hecho, mientras que en el miógrafo de presión, la longitud del segmento incrementa con aumentos en la presión intraluminal causando una enroscadura ("kinking") del segmento y haciendo la medida del diámetro imposible. Sin embargo, es posible corregir este hecho con un tornillo micrométrico y colocar las paredes del vaso en paralelo, aunque es muy fácil sobreestimar el segmento en el plano axial (BERCZI y col., 1992). Se espera que con estudios de microscopía confocal sea posible resolver este problema e indicar cuál es el punto donde el estiramiento en dirección axial es óptimo.

Otra de las ventajas del miógrafo microvascular de alambres, comparado con el miógrafo de presión, es que el número de ramificaciones en segmentos de arterias coronarias no influye en las medidas de fuerza, mientras que en el miógrafo de presión este hecho conduce muchas veces a escapes del tampón y disminución de la presión intraluminal. Con la resolución de algunos problemas técnicos del miógrafo de presión, éste probablemente puede ser un suplemento importante para la investigación con el miógrafo microvascular de alambres, ya que

proporciona medidas incluso más fisiológicas de las arterias coronarias.

Con el fin de aplicar al segmento vascular una fuerza pasiva específica y óptima en el miógrafo de alambres, en el presente estudio se ha utilizado el método descrito por MULVANY y WARSHAW (1979), determinando la relación entre tensión activa y pasiva y la circunferencia interna del segmento vascular. Para determinar la fuerza activa, se utilizó una solución de ACh y K-PSS que induce una respuesta máxima y reproducible a una determinada circunferencia de las arterias de resistencia coronarias (Fig. 3). Así, se determinó que el desarrollo de fuerza es óptimo a un 90% de la circunferencia interna (L_{100}) que el vaso tiene cuando está sometido a una fuerza pasiva que corresponde a una presión transmural de 100 mmHg (13.3 KPa) (Fig. 4A). Esta observación está de acuerdo con estudios realizados anteriormente en arterias coronarias de rata y conejo (NYBORG y col., 1987; SIMONSEN y col., 1992). A una circunferencia interna del 90% de L_{100} , la tensión pasiva de las arterias coronarias de resistencia corresponde a la aplicación de una presión transmural de 40 mmHg, que está por debajo de la presión medida (60 mmHg) en arterias mesentéricas de ratas conscientes (CHRISTENSEN y MULVANY, 1993). En otros lechos vasculares como la circulación coronaria de resistencia (CHILIAN, 1991), se ha medido la presión sanguínea en animales anestesiados obteniéndose valores bastante diferentes de las presiones sanguíneas medidas en animales conscientes (CHRISTENSEN y MULVANY, 1993). En conclusión, son necesarios estudios adicionales que determinen la presión óptima para el estudio de arterias de resistencia in vitro, aunque la determinación de la relación entre tensión activa y pasiva y la circunferencia interna, proporciona una

aproximación rápida al punto en el cuál el desarrollo de fuerza en el vaso es óptimo.

Con el fin de estimar la contractilidad e integridad funcional del segmento vascular después de la determinación del diámetro de la luz, se estimularon las arterias varias veces con una solución rica en potasio hasta que la respuesta fue reproducible, lo que se obtuvo después de estimular los segmentos 3 ó 4 veces al principio de la experiencia. El desarrollo de fuerza máximo en las arterias coronarias de resistencia fue determinado con KPSS y con ACh (10^{-5} M) y fue menor que el descrito para arterias sistémicas de resistencia (SIMONSEN y col., 1991). Esta diferencia podría ser debida a diferencias en la estructura de los vasos y en las necesidades funcionales, dependiendo del lecho vascular. En primer lugar, las arterias coronarias de resistencia están inmersas en el miocardio y la capa muscular no necesita desarrollar una presión transmural tan grande como en las arterias mesentéricas, que no están rodeadas por un tejido contráctil. En segundo lugar, su capa muscular longitudinal podría reducir la producción de fuerza en dirección transversal debido a su orientación en otro plano. Considerando que la presión extravascular generada por el miocardio contribuye con un 25% de la resistencia total (DOWNEY, 1982), se ha utilizado una presión transmural mayor que 10 kPa, como umbral para considerar una preparación coronaria con sus capas musculares funcionalmente intactas. El parámetro establecido en vasos de la circulación sistémica ha sido 13 kPa (100 mmHg) (MULVANY y WARSHAW, 1979; SIMONSEN y col., 1991).

En base a estudios in vivo o con órganos aislados, se ha sugerido que la circulación coronaria, al igual que la circulación cerebral, mesentérica y renal, posee propiedades de autorregulación en un rango determinado de presiones sanguíneas (JOHNSON, 1980). Investigaciones recientes en arterias de resistencia aisladas del lecho vascular cerebral, renal, mesentérico y coronario han indicado que estas arterias contraen en respuesta a incrementos y dilatan en respuesta a reducciones de la presión transmural, sugiriendo que el tono miogénico constituye una parte importante de la autorregulación (KUO y col. 1988, 1990; SUN y col., 1992; MENINGER y DAVIS, 1992; OSOL y col. 1993).

En el presente estudio, se ha utilizado una solución carente de calcio o papaverina para evaluar la presencia de tono miogénico, que a su vez se ha considerado como uno de los criterios de integridad funcional de los vasos coronarios de resistencia (KUO y col. 1988). Se encontró que el tono miogénico incrementa con incrementos de la circunferencia interna del vaso, en contraste con el desarrollo de fuerza activa que llega al máximo a un 90% de la circunferencia L_{100} (Fig. 4B). El tono miogénico depende de la concentración de calcio extracelular y en arterias coronarias de rata se ha demostrado que es bloqueado por antagonistas de calcio y adenosina (NYBORG y MIKKELSEN, 1985). Es posible que el tono miogénico de las arterias coronarias esté mediado por cambios calcio-dependientes en el potencial de membrana (SPERELAKIS, 1982). Además de la dependencia de la presencia del calcio extracelular, la activación de una proteína G y de la proteína quinasa C parecen jugar un papel en el mantenimiento del tono miogénico (OSOL y col., 1993).

En resumen, se han establecido dos criterios para obtener una preparación funcionalmente íntegra. En primer lugar, el criterio de capacidad de contracción y en segundo lugar la presencia de tono miogénico en la preparación arterial.

5.2 La respuesta a la acetilcolina en la circulación coronaria

Como se ha indicado anteriormente, existen controversias sobre cuál es la respuesta a la ACh bajo condiciones fisiológicas o normales. En colaboración con Adrian Chester y Sir Magdi Yacoub del British National Heart and Lung Institute (Harefield, Inglaterra), se examinaron arterias de corazones extraídos de pacientes que habían recibido un trasplante de corazón. Del primer paciente, un niño de cuatro años de edad con cardiomiopatía restrictiva, se aislaron y se montaron en un miógrafo microvascular de alambres 6 arterias de la aurícula derecha y 8 arterias del ventrículo izquierdo (**Fig. 5-6**); en la mitad de las preparaciones se añadió ACh sobre la línea base y en la otra mitad sobre una preconstricción estable inducida con U46619. El único efecto de la ACh observado en las arterias aisladas de la aurícula fue vasoconstricción, a pesar de que el endotelio estaba funcionalmente íntegro, como se deduce de la relajación al vasodilatador dependiente del endotelio, sustancia P (**Fig. 6**). Estos resultados coinciden con resultados obtenidos en arterias coronarias de la misma localización anteriormente publicados (ANGUS y col., 1991a). Se obtuvieron más muestras de la aurícula derecha de pacientes donde se había realizado un bypass, pero en muestras de 5 pacientes no se encontraron arterias con una luz interna suficientemente grande para poder ser montadas en el miógrafo. En las arterias aisladas del ventrículo

izquierdo del primer paciente examinado, la ACh tuvo el mismo efecto vasoconstrictor (Fig. 6). Sin embargo, en estudios clínicos con infusión de ACh se ha observado un efecto de vasodilatación en la circulación coronaria (HODGSON y MARSHALL, 1989). En el otro paciente examinado, una mujer de 45 años que había recibido un trasplante de corazón debido a enfermedad isquémica del corazón, se aislaron y examinaron arterias del ventrículo izquierdo y se observó que la ACh solamente inducía relajación sobre una precontractión y únicamente tuvo un ligero efecto vasoconstrictor a concentraciones muy altas (Fig. 7). Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por COOPER y HEAGERTHY (1992). Estos autores también observaron relajación a la ACh en arterias coronarias aisladas del ventrículo izquierdo de pacientes con enfermedad isquémica del corazón. En resumen, es difícil predecir cuál es la respuesta a la ACh en la circulación coronaria humana bajo condiciones normales, ya que en la mayoría de los casos el material examinado procede de pacientes con enfermedad de esta circulación y los corazones normales disponibles se utilizan para trasplantes. La alternativa al estudio de la circulación coronaria es el examen de arterias coronarias obtenidas de autopsias, y en estas condiciones muchas veces existen alteraciones de las funciones endotelial y nerviosa (SCHRÖR y VERHEGGEN, 1988).

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente estudio se ha buscado un modelo animal para caracterizar y estudiar las respuestas funcionales a la ACh. Con este propósito, se examinaron arterias coronarias de resistencia de varias especies, encontrando que el efecto de la ACh en la rata, conejo y perro es

predominantemente relajante, mientras que en las arterias coronarias del cerdo y cordero la respuesta fue vasoconstrictora (**Fig. 8**). Estudios previos han observado únicamente vasoconstricción a la ACh en arterias del cerdo y ningún efecto relajante sobre una preconstricción (NAKAYAMA y col., 1988; TSCHUDI y col., 1991).

En segmentos proximales de la LDA donde se examinó un posible efecto vasorelajante de la ACh, solo se encontró relajación a la ACh en 1 de 20 preparaciones (5%) (**Fig. 9**). Otros autores no encontraron ningún efecto relajante de la ACh en segmentos de la misma arteria del cordero (KALSNER, 1985). La frecuencia de relajación a la ACh es más alta (70%) en segmentos de LDA aislados de corazones bovinos y examinados con el mismo protocolo que el utilizado en el presente estudio (BRUNNER y col., 1991a), pero similar a la observada en segmentos de arterias coronarias humanas (FÖRSTERMANN y col. 1986). Comparada con las partes proximales de la circulación coronaria del mismo animal, la frecuencia de relajación a la ACh fue más alta en las arterias pequeñas. En 5 de 25 preparaciones (20%) de las arterias coronarias de resistencia del cordero, se encontró relajación a la ACh (**Fig. 10**).

Debido a su similitud en cuanto a reactividad a la ACh con las arterias coronarias humanas, se eligieron las arterias coronarias aisladas del corazón de cordero como modelo experimental para el estudio de la respuesta a la ACh. Las arterias de resistencia utilizadas proceden de la zona de la pared del ventrículo izquierdo afectada con mayor frecuencia por infartos de miocardio. Además de la

ACh, se examinó el efecto de otros agonistas en las arterias de resistencia del cordero, encontrando un efecto predominantemente relajante para la noradrenalina, 5-hidroxitriptamina e histamina (Fig. 11). Excepto en la respuesta a la 5-hidroxitriptamina, las arterias de resistencia del cordero fueron similares a las arterias coronarias humanas (Adrian Chester, comunicación personal).

Antes de proceder a la investigación de las respuestas colinérgicas, se realizó un estudio de reproducibilidad de las respuestas contráctiles en estas arterias. Las respuestas contráctiles a la ACh en los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente no fueron reproducibles, y se redujeron sucesivamente con la construcción de la segunda, tercera y cuarta curva concentración-respuesta a la ACh (Fig. 12, Tabla 1). Por el contrario, en las arterias coronarias de resistencia del cordero las curvas concentración-respuesta a la ACh fueron reproducibles hasta cuatro veces (Fig. 13). La utilización de un agonista colinérgico resistente a la acetilcolinesterasa, el carbacol, no evitó la disminución de respuesta de la segunda curva comparada con la primera curva contráctil, en segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente (Fig. 14A), pero la respuesta al agonista fue reproducible en las arterias de resistencia (Fig. 15). La retirada mecánica del endotelio tampoco evitó la reducción de la respuesta al agonista colinérgico en una segunda exposición, excluyendo la influencia de un factor endotelial en este fenómeno de desensibilización (Fig. 14B). En arterias coronarias grandes aisladas del cerdo, también se ha descrito una desensibilización de la respuesta a la ACh con estimulaciones sucesivas en vasos con el endotelio intacto (TANZ y NAYLER,

1991; HASHIMOTO y col., 1993; MATSUMOTO y col., 1994), y TANZ y NAYLER (1991) observaron que la desensibilización era dependiente de la concentración de ACh utilizada. Cuando estimulaban con una concentración de ACh mayor que 10^{-6} M, se redujo la respuesta a este agonista con exposiciones sucesivas, mientras que este efecto no se observó con concentraciones menores. Recientemente, HASHIMOTO y col. (1994) han descrito que la respuesta a la ACh se reduce con estimulaciones sucesivas en vasos con endotelio intacto, pero no en vasos desprovistos de células endoteliales. Sin embargo, estos autores solo llegaron a estimular con una concentración máxima de ACh de 3×10^{-6} M, mientras que en nuestro estudio y en los estudios mencionados anteriormente, la concentración máxima de ACh utilizada fue 10^{-5} M (Fig. 12) (TANZ y NAYLER, 1991; MATSUMOTO y col., 1993). Además, HASHIMOTO y colaboradores (1994) encontraron que el contenido de GMPc se redujo también con las estimulaciones sucesivas con ACh, lo cual indica que la desensibilización de la respuesta contráctil a la ACh no se debe a un incremento de la liberación de EDRF. La desensibilización de la respuesta contráctil a la ACh en las arterias grandes del cordero podría ser debida a una liberación presináptica de otro neurotransmisor, pero no encontramos ningún efecto sobre la desensibilización después del tratamiento con tetrodotoxina. Nuestros resultados sugieren que puede tratarse de un fenómeno ligado al receptor muscarínico que media la respuesta contráctil a la ACh, ya que la respuesta contráctil a la 5-hidroxitriptamina fue reproducible en las arterias coronarias grandes (Fig. 15A) a pesar de que no ocurrió lo mismo en el caso de la relajación inducida por este agonista en las arterias coronarias de resistencia (Fig. 15B). La desensibilización de la respuesta a la ACh puede estar,

por tanto, limitada al receptor o al acoplamiento receptor-segundo mensajero. Estudios recientes en músculo visceral han demostrado que la desensibilización de la respuesta a la ACh no se debe a una alteración en la unión agonista-receptor o en la regulación "feedback" del receptor por la proteína quinasa C, sino que probablemente pueda ser debida a un alteración en la capacidad de acoplamiento entre el receptor y las proteínas G (ZHANG y BUXTON, 1993, LARSSON y SIMONSSON, 1993; HISHINUMA y col., 1993).

Hay que destacar la diferencia regional observada con respecto a la desensibilización de la respuesta a la ACh en la circulación coronaria del cordero (Fig. 12 y 13). Una vasoconstricción mantenida de las arterias coronarias de gran calibre podría conducir a una reducción importante y comprometer seriamente el flujo sanguíneo coronario, y por tanto, la desensibilización de la respuesta a un vasoconstrictor como la ACh podría constituir un mecanismo fisiológico protector para preservar el flujo sanguíneo.

5.3 Actividad colinacetiltransferasa (ChAT), acetilcolinesterasa (AChE) y efecto de la inhibición de la AChE

La actividad enzimática específica fue significativa en todas las preparaciones examinadas en el presente trabajo, indicando la presencia de ChAT. Dicha actividad fue alta en las arterias piales, el miocardio y en las arterias coronarias de resistencia, mientras que en segmentos proximales de la arteria coronaria descendente anterior fue más baja (Fig. 17).

La cuantificación bioquímica de la actividad de ChAT se ha utilizado como índice de la inervación colinérgica en el corazón (LUND y col., 1979) y la circulación cerebral (HAMEL y col., 1987; ESTRADA y col. 1988), y la inmunoreactividad al ChAT en el sistema nervioso central y en las arterias cerebrales (ECKENSTEIN y BAUGMAN, 1984; SAITO y col., 1985; MIAO y LEE, 1992). En el corazón, la actividad ChAT puede proceder de dos fuentes neuronales: (1) La inervación parasimpática preganglionar y (2) la inervación parasimpática postganglionar. Sin embargo también se ha observado actividad ChAT en tejido no innervado como la placenta, donde la ACh sintetizada localmente participa en el transporte de aminoácidos en los capilares (ROWELL y SASTRY, 1981). La única preparación en el presente estudio que contiene capilares es el miocardio. Ya que no existe ninguna indicación de que las células miocárdicas tengan actividad ChAT (ROSKOSKI y col. 1977; LUND y col., 1978), la actividad enzimática determinada en las muestras de miocardio en el presente estudio podría atribuirse en parte a los capilares, y en parte a la presencia de una inervación colinérgica. Una pequeña parte de la actividad ChAT determinada en las arterias podría proceder de las células endoteliales, ya que en arterias cerebrales y arterias coronarias de rata se ha demostrado inmunoreactividad para ChAT en el endotelio (PARNAVELAS y col., 1985; MILLNER y col., 1988). Sin embargo, la retirada mecánica del endotelio en la circulación cerebral no indujo una reducción significativa de la actividad ChAT, y se ha sugerido que la contribución de las células endoteliales a la actividad ChAT total es pequeña (HAMEL y col., 1987). Los presentes resultados demuestran una actividad ChAT alta en las arterias coronarias de resistencia del cordero, comparable a la observada

en las arterias piales de los mismos animales. La actividad ChAT encontrada en las arterias piales es similar a la anteriormente descrita en arterias piales de la cabra (ESTRADA y col., 1988). En resumen, nuestros resultados indican una presencia de ChAT en las arterias coronarias de cordero con una densidad similar a la observada en arterias piales, una circulación en la que ya se ha establecido la presencia de una inervación colinérgica.

A diferencia de las arterias coronarias de resistencia, la actividad ChAT determinada en los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente fue mucho menor. Estos resultados coinciden con las descritos en la circulación cerebral, en la cual la actividad ChAT es mayor en los vasos grandes que en los pequeños (ESTRADA y col., 1988), y sugieren que la síntesis de ACh podría ser mayor y la inervación más densa en las arterias coronarias de resistencia que en las partes proximales de la circulación coronaria. Observaciones similares han sido descritas en la circulación coronaria humana, donde la inervación peptidérgica fue más pronunciada en las arterias distales comparadas con las arterias proximales (GULBENKIAN y col., 1993).

En secciones de la arteria coronaria izquierda descendente, la actividad AChE fue visualizada en forma de un precipitado marrón dentro de fibras nerviosas localizadas en la unión adventicia-media (Fig. 18B). No se detectó actividad AChE en la parte interior de la media o en el endotelio. En secciones de miocardio del ventrículo izquierdo se detectaron fibras AChE-positivas, principalmente en relación con las arterias pequeñas intramiocárdicas, pero no con las venas (Fig.

18F). Igualmente, en preparaciones aisladas de arterias de resistencia, se observaron fibras nerviosas AChE discurriendo en la superficie adventicial (Fig. 18C,D,E). En preparaciones tratadas con fisostigmina no se visualizó ningún precipitado indicador de actividad AChE, confirmando la especificidad de la reacción histoquímica. La distribución de las fibras nerviosas AChE-positivas se correlaciona con la distribución de la actividad ChAT, lo cual nos lleva a sugerir que existe una distribución regional de la inervación colinérgica en la circulación coronaria del cordero, estando las partes distales o intramiocárdicas de la circulación más densamente inervadas que las proximales. Estos resultados coinciden con los descritos previamente para los nervios catecolaminérgicos (GULBENKIAN y col., 1990) y peptidérgicos (GULBENKIAN y col., 1993), e igualmente estarían de acuerdo con estudios neuroanatómicos clásicos que identifican fibras nerviosas presuntamente vagales, mediante impregnación con plata o inyección intravital de azul de metileno, y que demuestran una densa inervación vagal de las arteriolas y los vasos precapilares coronarios (WOOLLARD, 1926; HIRSCH y BORGHARD-ERDLE, 1961). Sin embargo, estudios histoquímicos previos en la circulación coronaria humana, sólo revelaron fibras AChE-positivas en las arterias epicárdicas grandes, pero no en las arterias intramiocárdicas (AMENTA y col., 1981), lo cual puede ser debido a la utilización de muestras postmortem obtenidas 24-36 horas después de la muerte (AMENTA y col., 1981). Por otro lado, la distribución de las fibras nerviosas AChE-positivas en la circulación coronaria del corazón de primates (PILLAY y REID, 1982) y del perro (GEROVA y col., 1979) es igual a la distribución observada en la circulación coronaria del cordero. La coincidencia de la actividad ChAT y la distribución de

las fibras AChE-positivas sugieren que la innervación colinérgica es más densa en la parte intramiocárdica de la circulación coronaria.

En secciones de la arteria coronaria izquierda descendente con miocardio adherido, se observaron células ganglionares de núcleo claro, agrupadas en forma de ganglios pequeños (Fig. 18A), y similares a las células ganglionares intracardiacas descritas en el septo interatrial de la rata (PARDINI y col., 1987). La localización de los ganglios observados por debajo del surco atrioventricular no corresponde a la localización de las células ganglionares intracardiacas descritas en la rata (PARDINI y col., 1987). Sin embargo, tanto el estudio morfológico (WOOLLARD, 1926) como la destrucción funcional de los ganglios vagales (BARBER y col., 1984) han sugerido la presencia de células ganglionares en el surco atrioventricular cerca de la arteria coronaria circunfleja, en una localización similar a la de los grupos de células ganglionares observados en el presente estudio. La persistencia tanto de la actividad AChE (DENN y STONE, 1976) como de la actividad ChAT (LUND y col., 1979) después de la vagotomía, han demostrado que la mayor parte de la innervación colinérgica del corazón tiene un origen intrínseco (ELLISON y HOBBS, 1976; JACOBOWITZ, 1976; BURNSTOCK, 1980), y teniendo en cuenta que la AChE está localizada selectivamente en un alto porcentaje de neuronas colinérgicas (CUELLO y SOFRONIEW, 1984; CRISWELL y BRANDON, 1993), los resultados del presente estudio apoyan que la circulación coronaria recibe una innervación colinérgica.

El inhibidor de la AChE, neostigmina, indujo un desplazamiento a la izquierda

de las curvas concentración-respuesta a la ACh en los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente, pero a la concentración utilizada no tuvo un efecto significativo en las arterias coronarias de resistencia (Fig. 19).

Por otro lado, otro inhibidor de la AChE, la fisostigmina, a concentraciones altas causó contracciones en los segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente y en las arterias coronarias de resistencia (Fig. 20, 21), no mostrando, sin embargo, ningún efecto relajante (Fig. 20). Este efecto contráctil podría ser atribuido exclusivamente a una inhibición de la AChE, produciendo incrementos en las concentraciones de ACh endógena, y consecuentemente, contracción. Un efecto contráctil similar se ha observado también con otros inhibidores de la AChE, neostigmina y BW284C51, en preparaciones de bronquios humanos aislados (NOREL y col., 1993). Sin embargo, la respuesta contráctil de estas preparaciones se produjo a concentraciones muchas más bajas de neostigmina (10^{-8} M) que en las arterias coronarias del cordero. Además, a concentraciones bajas (10^{-8} - 10^{-6} M), la fisostigmina y la neostigmina inhiben la actividad AChE, mientras que a concentraciones más altas (10^{-5} - 10^{-3} M), desplazan la unión de ligandos muscarínicos en homogenizados de corteza cerebral (TRIGUERO y col., 1987). La sensibilidad para el efecto contráctil directo de la fisostigmina y los desplazamientos paralelos a la derecha de las curvas concentración-respuesta a la fisostigmina en presencia de atropina, indican que este efecto contráctil se debe a una acción directa sobre receptores muscarínicos de la circulación coronaria del cordero.

A concentraciones bajas que no inducían contracción, la fisostigmina causó un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh en los segmentos de la arteria coronaria izquierda descendente y de las arterias coronarias de resistencia. Las concentraciones de neostigmina y fisostigmina aplicadas en el presente trabajo causan porcentajes de inhibición de la actividad AChE del 80 y 100%, respectivamente, en la corteza cerebral (TRIGUERO y col., 1987). Este hecho puede explicar que la fisostigmina, que inhibe en mayor medida que la neostigmina la actividad AChE, induzca un desplazamiento significativo a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh en las arterias coronarias de resistencia, que por el contrario, no se ven afectadas por la neostigmina (Fig. 22, 23). El efecto de la fisostigmina parece ser específico sobre la AChE ya que no alteró las curvas concentración-respuesta al carbacol (Fig. 24). El desplazamiento a la izquierda inducido en las curvas concentración-respuesta a la ACh por la fisostigmina, tanto en preparaciones con endotelio intacto como en preparaciones desprovistas de endotelio, indica que existe una metabolización activa de la ACh en las arterias coronarias de resistencia y confirma los estudios histoquímicos que demuestran una presencia de fibras AChE-positivas en el parte exterior de la arteria, en la union adventicia-media. La degradación de la ACh por la butirilcolinesterasa no parece tener un papel fisiológico relevante en la circulación coronaria de resistencia, ya que el inhibidor de dicha enzima, el ISO-OMPA, no tuvo efecto en una concentración a la que (Fig. 25, Tabla 2), anteriormente se ha descrito que inhibe esta enzima en las vías respiratorias humanas y caninas (ADLER y col., 1991; NOREL y col., 1993).

En resumen, se ha descrito la existencia tanto de actividad ChAT como actividad AChE en la circulación coronaria del cordero, con mayor actividad o presencia en las arterias coronarias de resistencia que en las partes proximales de la circulación, y la coincidencia en la distribución de las enzimas de síntesis y metabolización de la ACh, sugiere que existe una inervación colinérgica probablemente intrínseca con mayor densidad en las arterias de resistencia.

5.4 Estimulación eléctrica de las arterias coronarias de resistencia

Ya que el efecto predominante de la ACh en las arterias coronarias de resistencia es contráctil, cabe esperar que la respuesta neurogénica y colinérgica también sea contráctil. Sin embargo, en preparaciones desprovistas de endotelio no se observó un efecto contráctil y sensible a la tetrodotoxina en respuesta a la estimulación eléctrica transmural (**Fig. 26**). En otros estudios de preparaciones aisladas de arterias coronarias grandes ovinas, sólo se observó un efecto relajante a la estimulación eléctrica y esta respuesta era mediada por la noradrenalina, mientras que tras la aplicación de los mismos parámetros que los utilizados en el presente estudio no se obtuvo ningún efecto contráctil (**BRINE y col., 1979**). Sin embargo, en arterias coronarias grandes porcinas y bovinas, la estimulación eléctrica indujo una respuesta contráctil sensible a la atropina sugiriendo su naturaleza colinérgica (**KALSNER y QUILLAN, 1989a; FURUSHI y col., 1988**). Mediante la aplicación de los mismos parámetros de estimulación eléctrica que los

descritos por KALSNER y QUILLAN (1989a) a las arterias coronarias de resistencia del cordero, sólo se observó un componente contráctil que no fue sensible a la tetrodotoxina, sugiriendo un efecto directo sobre el músculo liso vascular. Sin embargo, también en presencia de fentolamina para bloquear los receptores α -adrenérgicos, y con las arterias precontraídas con U44619, la estimulación eléctrica indujo una pequeña relajación frecuencia-dependiente (Fig. 27, 28). En presencia de atropina, estas relajaciones neurogénicas de las arterias de resistencia fueron más pronunciadas (Fig. 27, 28), indicando la existencia de una liberación endógena de ACh, con un efecto inhibitorio sobre la respuesta relajante a la estimulación eléctrica. Diversos estudios han intentado caracterizar la respuesta no-neurogénica e inhibitoria de las arterias coronarias grandes (ROOKE y col., 1982; GANTZOS y col., 1983; KEEF y KREULEN, 1988; KALSNER y QUILLAN, 1988b; FELETOU y VANHOUTTE, 1989); sin embargo, con los parámetros de estimulación eléctrica aplicados en el presente trabajo se observó que la respuesta inhibitoria era bloqueada por la tetrodotoxina, indicando su naturaleza neurogénica (Tabla 3).

En presencia de fentolamina y atropina, el bloqueante de los receptores β -adrenérgicos, propranolol, no tuvo ningún efecto sobre las respuestas inducidas con estimulación eléctrica. Estos resultados indican la liberación de un neurotransmisor no-adrenérgico no-colinérgico vasorelajante cuya naturaleza no se ha descrito anteriormente en arterias coronarias aisladas. El neurotransmisor no-adrenérgico, no-colinérgico liberado y con efecto relajante probablemente está enmascarando un efecto contráctil directo de la ACh endógena sobre el músculo liso vascular, o

bien el efecto de la ACh endógena podría ser un efecto presináptico, inhibiendo la liberación del neurotransmisor inhibitorio no-adrenérgico no-colinérgico. En otras preparaciones vasculares donde se libera ACh con la estimulación eléctrica y causa relajación a través de receptores en el músculo liso, la presencia de fisostigmina incrementa las relajaciones (BRAYDEN y BEVAN, 1985; BRAYDEN y LARGE, 1986; NEILD y col., 1990). En las arterias coronarias de resistencia, la fisostigmina no tuvo un efecto significativo o inhibió la relajación a la estimulación eléctrica (Fig. 28, Tabla 3). En arterias coronarias grandes caninas, donde se ha demostrado que la ACh tiene un efecto inhibitorio sobre la vasodilatación mediada por noradrenalina a través de receptores muscarínicos presinápticos localizados en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, la fisostigmina tampoco alteró la liberación de noradrenalina (COHEN y col., 1984a). Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten distinguir si el componente de la estimulación eléctrica sensible a la atropina es presináptico o postsináptico, pero la presencia de este componente indica la presencia de una inervación colinérgica funcional de las arterias coronarias de resistencia del cordero.

5.5 Caracterización del receptor muscarínico contráctil

La respuesta contráctil a la ACh predomina en arterias coronarias de resistencia del cordero y el presente estudio fue realizado con el objeto de caracterizar el receptor postsináptico que media la contracción, mediante la utilización de agonistas y antagonistas muscarínicos selectivos. Los agonistas utilizados con excepción del McN-A-343 produjeron una contracción completa de las arterias

coronarias de resistencia del cordero (Fig. 29A). La metacolina, oxotremorina-M y ACh fueron equipotentes y más potentes que el carbacol y que el McN-A-343. Además, la diferencia entre la respuesta a la ACh y carbacol observada en arterias con endotelio intacto persistió en vasos desprovistos de endotelio (Fig. 29B). Estos resultados están de acuerdo con otros estudios de receptores muscarínicos que sugieren que un subtipo M_3 de receptores muscarínicos está implicado en la respuesta a la ACh en las arterias coronarias bovinas (DUCKLES, 1988; DUCKLES y GARCIA-VILLALON, 1990). El agonista muscarínico, McN-A-343, no indujo ningún efecto contráctil sobre la tensión basal de nuestra preparación, observación similar a la descrita en arterias coronarias grandes (DUCKLES, 1988). Sin embargo, en presencia de 10 mM de KPSS, se observó una contracción correspondiente a un $23.3 \pm 5.6\%$ de la E_{max} en estas arterias (Fig. 30), y con una potencia que coincide con la anteriormente descrita en la arteria de la oreja del conejo (DUCKLES, 1988). Se ha sugerido que el McN-A-343 es un agonista selectivo para los receptores M_1 (HAMMER y GIACHETTI, 1982; JOKISCH-MEHLING y col., 1989), pero tiene un efecto variable sobre todos los subtipos de receptores muscarínicos dependiente de la reserva de receptores de la preparación (EGLIN y col., 1987; JOKISCH-MEHLING y col., 1989). El agonismo débil del McN-A-343 sobre los receptores M_2 y M_3 excluye que un receptor del subtipo M_1 esté implicado en la respuesta a la ACh. Sin embargo, la falta de agonistas muscarínicos selectivos cuestiona el uso de agonistas para la identificación de un determinado subtipo de receptor muscarínico, y por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando agonistas no permiten definir que subtipo de receptores muscarínicos median la contracción a la ACh en las

arterias coronarias de resistencia.

En preparaciones con endotelio intacto, el antagonista selectivo, pirenzepina, inhibió de manera no-competitiva las curvas concentración-respuesta a la ACh en las arterias coronarias de resistencia del cordero, produciendo un desplazamiento no-paralelo de las curvas, con depresión de la respuesta máxima a este agonista (Fig. 31A). La pendiente de Hill de las curvas de ACh en ausencia de pirenzepina fue 1.20 ± 0.06 ($n=8$), y en presencia de $3 \times 10^{-7}M$, $10^{-6}M$ y $3 \times 10^{-6}M$ de pirenzepina, las pendientes fueron 0.80 ± 0.13 ($P < 0.05$, t-test pareado), 0.78 ± 0.14 ($P < 0.05$) y 0.65 ± 0.14 ($P < 0.05$), respectivamente. Sin embargo, en arterias desprovistas de endotelio, la pirenzepina produjo un desplazamiento paralelo a la derecha de las curvas concentración-respuesta a la ACh (Fig. 31B). El análisis de SHILD del antagonismo de la respuesta a la ACh en las arterias coronarias de resistencia con endotelio intacto dio una recta de regresión con una pendiente diferente de la unidad, mientras que en preparaciones desprovistas de endotelio la pendiente no fue significativamente diferente de la unidad (Fig. 31, 32, Tabla 5).

El antagonista selectivo para los receptores M_2 , AFDX 116, y los antagonistas selectivos para los receptores, M_3 , 4-DAMP y pFHHSiD produjeron un antagonismo competitivo de la ACh en arterias con y sin endotelio (Fig. 33-36, Tabla 5).

Todos los antagonistas muscarínicos examinados en arterias coronarias de resistencia del cordero desprovistas del endotelio, actuaron como antagonistas

competitivos de la respuesta a la ACh. Además, en ausencia de endotelio, las pendientes de las líneas de regresión del análisis de ARUNLAKSHANA-SCHILD no fueron diferentes de la unidad, lo que sugiere que la contracción inducida por la ACh está mediada por una población homogénea de receptores muscarínicos en el músculo liso.

En las arterias coronarias de resistencia desprovistas del endotelio, la afinidad para la pirencepina ($pK_B=7.5$) no es comparable a la alta afinidad (7.7-8.1) descrita en lugares de unión M_1 en la corteza cerebral, o a su baja afinidad (6.5-6.7) en los receptores cardiacos M_2 , pero similar a la afinidad intermedia (6.8-7.5) por los receptores del subtipo M_3 en el músculo liso visceral y vascular y en las glándulas (EGLÉN y WHITING, 1985; DELMENDO y col., 1989; HULME y col., 1990; DAUPHIN y HAMEL, 1990; BRUNNER y col., 1991b). Esto sugiere que los receptores muscarínicos M_1 no median la respuesta contráctil a la ACh. Además, la baja potencia del AFDX 116 no apoya un papel de los receptores muscarínicos del subtipo M_2 en la respuesta a la ACh, pero indica la presencia de receptores muscarínicos del subtipo M_3 . El potente desplazamiento paralelo de las curvas concentración-respuesta a la ACh en presencia de los antagonistas M_3 , 4-DAMP y pFHHSiD sugiere que un subtipo de receptores M_3 media la contracción. A pesar de que se ha demostrado que el 4-DAMP tiene igual afinidad por los receptores del subtipo M_1 y M_3 (DELMENDO y col., 1989; HULME y col., 1990), el pFHHSiD mostró alta afinidad en nuestra preparación, relacionada con la presencia de un receptor muscarínico del subtipo M_3 (7.8-8.2; LAMBRECHT y col., 1988; EGLÉN y col., 1990; DUCKLES, 1990).

En resumen, las afinidades y el orden de potencia de los antagonistas muscarínicos (pFHHSiD > pirencepina > AFDX 116) en las preparaciones desprovistas de endotelio sugiere que el receptor muscarínico que media el efecto contráctil a la ACh en las arterias coronarias de resistencia pertenece al subtipo M₃. Esta observación está de acuerdo con otros estudios funcionales realizados in vitro en arterias coronarias grandes bovinas (DUCKLES, 1990; DUCKLES Y GARCIA-VILLALON, 1990; BRUNNER y col., 1991b) y porcinas (VAN CHARLDORP y VAN ZWIETEN, 1989), y también con estudios in vivo de la circulación coronaria canina donde el AFDX 116 tuvo afinidad baja y la pirencepina afinidad intermedia por los receptores muscarínicos que median la vasoconstricción a la ACh infundida (PELC y col., 1988).

En presencia de endotelio, las respuestas a los agonistas y la acción de los antagonistas fueron diferentes de las respuestas obtenidas en preparaciones desprovistas de endotelio. El efecto contráctil de la ACh fue menos potente en presencia de endotelio, mientras que las respuestas al carbacol no fueron alteradas (Tabla 4). Resultados similares demostrando un cambio diferencial en las respuestas a la ACh y carbacol, en presencia o ausencia de endotelio, se han observado en la traquea de cobaya, siendo atribuidos a diferencias de los esteres de colina en su capacidad de difundir a los receptores muscarínicos del músculo en preparaciones con el epitelio intacto (MORRISON y VANHOUTTE, 1992). El endotelio podría constituir una barrera al paso de la ACh en las arterias coronarias de resistencia. Si la capacidad de la barrera endotelial fuera saturada a concentraciones altas del agonista, entonces el estado de equilibrio del agonista,

antagonista y población de receptores podría cambiarse y así obtenerse una pendiente de ARUNLAKSHANA-SCHILD para la pirencepina menor que la unidad (KENAKIN, 1987). Sin embargo, en presencia de endotelio, la pendiente de ARUNLAKSHANA-SCHILD para la pirencepina fue mayor que la unidad y el antagonismo producido por el AFDX 116 sobre la contracción inducida por la ACh no fue alterado por la retirada del endotelio. Esto sugiere que el desplazamiento no competitivo de la respuesta contráctil a la ACh en ausencia de endotelio no se debe al hecho de que el endotelio funcione como una barrera de difusión para la ACh.

En ciertos aspectos, los resultados del presente estudio pueden ser comparados con los del estudio publicado por ALOSACHIE y GODFRAIND (1988) sobre el papel del endotelio en la interacción de los agonistas y antagonistas α -adrenérgicos en la aorta de rata. Estos autores observaron que los antagonistas α_1 -adrenérgicos actuaron como antagonistas no-competitivos frente a la noradrenalina en presencia de endotelio y como antagonistas competitivos después de la retirada mecánica del endotelio. Por el contrario, el antagonista α_2 -adrenérgico, yohimbina, y el α -adrenérgico, fentolamina, actuaron como antagonistas competitivos en presencia y ausencia del endotelio, a pesar de que los valores de pA_2 de los dos últimos antagonistas fueron menores en vasos con el endotelio intacto. En el presente estudio, la pirencepina actuó como antagonista no-competitivo frente a la ACh en presencia de endotelio y como antagonista competitivo en ausencia de endotelio, mientras que el AFDX 116 y pFHHSiD actuaron como antagonistas competitivos en arterias sin y con endotelio, a pesar de que el pK_B del pFHHSiD fue más bajo

en vasos con endotelio intacto (**Tabla 5**). ALOSACHIE y GODFRAIND (1988) sugirieron que sus resultados podrían ser debidos a una liberación continua y basal de EDRF, que actuaría como antagonista funcional reduciendo la eficacia aparente de los agonistas adrenérgicos, y de esta manera originando un antagonismo no-competitivo del prazosin frente a la noradrenalina en preparaciones con endotelio. En el presente estudio, también se observó un incremento en la tensión basal de las preparaciones después de la retirada del endotelio, lo cual indica un inhibición de la liberación basal de EDRF como se ha demostrado anteriormente en arterias coronarias de resistencia (PRIETO y col., 1991a; TSCHUDI y col., 1991; MYERS y col., 1991).

Una explicación alternativa del estudio de antagonistas muscarínicos podría ser que la ACh activa una población heterogénea de receptores muscarínicos con efectos opuestos en las arterias coronarias de resistencia del cordero: receptores contráctiles del subtipo M_3 en el músculo liso y receptores muscarínicos inhibitorios que producen relajación a través del endotelio. Por tanto, podría existir una liberación de EDRF mediada por receptor que funciona como antagonista endógeno, reduciendo la eficacia de la ACh y produciendo un antagonismo no-competitivo de la pirencepina frente a la respuesta contráctil de la ACh en preparaciones con endotelio intacto. En este último tipo de preparaciones, la incubación con concentraciones bajas de pirencepina (10^{-9} - 10^{-7} M) o telencepina (10^{-10} - 3×10^{-8} M) indujeron un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh (**Fig. 37, Tabla 6**), pero tras la retirada mecánica del endotelio, bajas concentraciones de pirencepina no tuvieron ningún efecto potenciador sobre

la respuesta a la ACh en las arterias coronarias de resistencia (**Tabla 6**). Esta última observación apoya el concepto de que la ACh puede activar receptores con efectos opuestos, ya que la ocupación de una pequeña población de receptores inhibitorios con la pirencepina o telencepina indujeron un desplazamiento significativo a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh. La ausencia de cambios en el plot de ARUNLAKSHANA y SCHILD para el AFDX 116 en las arterias coronarias sin y con endotelio, podría ser atribuída a la baja afinidad que este antagonista tiene por los receptores del subtipo M_1 y M_3 . Sin embargo, son necesarias investigaciones posteriores para explicar el cambio en el plot para el pFHHSiD, inducido por la retirada del endotelio en las arterias coronarias de resistencia. Este resultado podría ser debido a varios factores como un desequilibrio temporal del complejo antagonista-receptor con el endotelio como una barrera de difusión para el pFHHSiD, o que el pFHHSiD tiene afinidad por otros lugares de la membrana diferentes de los receptores muscarínicos en presencia del endotelio, dando un valor artificial y más bajo que el pK_b real (KENAKIN, 1987). Finalmente, el cambio podría estar motivado por la retirada de la liberación basal o inducida por agonista de EDRF. El último caso implica la presencia de una población heterogénea de receptores muscarínicos en vasos con endotelio.

5.5 Caracterización del receptor muscarínico relajante

Diversos resultados del presente estudio indican la presencia de receptores muscarínicos en las células endoteliales de las arterias coronarias de resistencia del

cordero. En primer lugar, la ACh tuvo un efecto relajante en un pequeño porcentaje de las preparaciones estudiadas. En segundo lugar, la retirada mecánica del endotelio produjo un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh. En tercer lugar, la incubación con bajas concentraciones de antagonistas muscarínicos M_1 produjeron un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh en arterias con endotelio (Fig. 37), pero no en arterias desprovistas de endotelio (Tabla 6). Estos hechos indican que los efectos observados en el estudio de antagonismo del receptor contráctil no se deben a la liberación basal de EDRF, sino a una liberación de EDRF inducida por un agonista muscarínico. Estas observaciones fueron apoyadas por el hecho que el agonista putativo selectivo para los receptores muscarínicos del subtipo M_1 , McN-A-343, indujo relajación en las arterias coronarias de resistencia precontraídas con U46619 (Fig. 38, 39). Esta relajación del McN-A-343 fue inhibida en presencia de bajas concentraciones del antagonista selectivo para los receptores M_1 , pirenzepina, pero no en presencia de pFHHSiD o AFDX 116 que bloquean los receptores M_3 y M_2 , respectivamente. La concentración de pirenzepina utilizada corresponde a la concentración que produce el desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh (Tabla 6). Estas observaciones, junto con la observación del efecto contráctil del McN-A-343, sugieren que la ACh no es el único agonista colinérgico que puede activar una población heterogénea de receptores muscarínicos con efectos opuestos en las arterias coronarias de resistencia, sino que el McN-A-343 es capaz de producir relajación y contracción en dichas arterias. En conjunto, estos resultados indican la presencia de una población inhibitoria de receptores muscarínicos en el endotelio, probablemente del

subtipo M_1 , que pueden modular la respuesta contráctil a la ACh producida a través de la activación de receptores M_3 en el músculo liso de las arterias coronarias de resistencia del cordero.

El presente hallazgo de que los receptores endoteliales pueden ser del subtipo M_1 y los receptores contráctiles del músculo liso del subtipo M_3 , estaría de acuerdo con estudios realizados in vivo en la circulación coronaria canina (PELC y col., 1988). Sin embargo, se ha sugerido que los receptores endoteliales que inducen relajación en las arterias coronarias grandes bovinas pueden pertenecer al subtipo M_3 (BRUNNER y col., 1991a), pero esto podría deberse a diferencias entre especies o a que existe una heterogeneidad de receptores muscarínicos, no solo entre el endotelio y el músculo liso, sino también entre las partes proximales y distales de la circulación coronaria (NYBORG y col., 1991), al igual que se ha observado entre las partes proximales y distales de la circulación cerebral (GARCIA-VILLALON y col., 1991).

Se ha sugerido recientemente que los receptores que median la vasodilatación a la ACh en las arterias de resistencia periféricas pertenecen al subtipo M_3 de receptores muscarínicos (HENDRIKS y col., 1992; BRUNING y col., 1994). En la circulación mesentérica de rata, encontramos valores de pK_B para los antagonistas muscarínicos que inhiben la vasodilatación a la ACh, que sugieren la presencia de un subtipo M_3 (Tabla 7). Sin embargo, los valores obtenidos en las arterias coronarias de resistencia de la rata sugieren la presencia de un subtipo de receptores muscarínicos que median la relajación a la ACh con características diferentes a las de los receptores muscarínicos de las arterias de resistencia

periféricas (**Tabla 7**), ya que los valores del estudio de antagonismo son diferentes de los del lecho vascular mesentérico y de los anteriormente observados en vasos periféricos humanos (BRUNING y col., 1994).

En resumen, nuestros resultados sugieren que los receptores muscarínicos de las arterias coronarias de resistencia son diferentes de los receptores muscarínicos que median la vasodilatación a la ACh en las arterias de resistencia periféricas y que pertenecen al subtipo M_1 , a pesar de que no podemos excluir receptores de los subtipos m_4 o m_5 .

5.7 Caracterización de la respuesta mediada por receptores nicotínicos

El efecto dominante de la nicotina en las arterias coronarias de resistencia fue un efecto contráctil. La nicotina (10^{-4} - 10^{-3} M) no tuvo ningún efecto cuando fue añadida sobre la línea base. Sin embargo, en preparaciones precontraídas con U46619, la nicotina (10^{-4} M) causó contracción, mientras que a una concentración de 10^{-3} M indujo una respuesta bifásica con una pequeña relajación seguida de una contracción muy pronunciada (**Fig. 40**). Esta contracción fue inhibida por la presencia del antagonista nicotínico, hexametonio y por el antagonista muscarínico, atropina, mientras que la fisostigmina no alteró de manera significativa la respuesta contráctil a la nicotina (**Fig. 41**). Estos resultados coinciden con los observados después de la infusión intracoronaria de nicotina en la circulación coronaria de ternera, donde este agente tuvo un efecto bifásico de vasoconstricción seguida por vasodilatación, y que fue inhibido por la presencia de hexametonio o atropina

(YOUNG y col., 1988). La nicotina activa probablemente receptores nicotínicos presinápticos que liberan ACh de nervios colinérgicos y estimula receptores muscarínicos en el músculo liso de las arterias coronarias de resistencia.

Sin embargo, la infusión de nicotina en la circulación coronaria canina induce vasodilatación que es revertida a vasoconstricción en presencia de antagonistas β -adrenérgicos (DOWNEY y col., 1977; WOODMAN y col., 1991), mientras que la vasoconstricción desaparece después de infusión de antagonistas α -adrenérgicos (WOODMAN y col., 1991). Además, en segmentos aislados de la rama circunfleja de la arteria coronaria izquierda del perro, la nicotina también originó relajación potenciada por la presencia de antagonistas α -adrenérgicos (TODA y HAYASHI, 1982). Por tanto, estos estudios sugieren una liberación predominante de noradrenalina de nervios adrenérgicos después de la activación de receptores nicotínicos presinápticos. Sin embargo, el efecto adrenérgico de la nicotina parece de menor importancia en las arterias coronarias del cordero, ya que la respuesta a la nicotina no fue alterada de manera significativa tras el bloqueo combinado con antagonistas α - y β -adrenérgicos. Las diferencias entre los resultados obtenidos en el presente estudio y en los estudios de la circulación coronaria canina, pueden ser atribuidos a diferencias entre especies (KALSNER, 1989).

En las arterias coronarias del cordero, el antagonista nicotínico, hexametonio, no alteró la respuesta a la ACh en concentraciones bajas (10^{-6} - 10^{-5} M) y específicas para los receptores nicotínicos, pero causó un pequeño desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh a concentraciones altas (10^{-4} M) (Fig. 42, Tabla 8), que también pueden actuar inhibiendo los receptores

muscarínicos (EGLÉN y col., 1989; PRIETO y col., 1994). La respuesta a la ACh infundida en la circulación coronaria de ternera tampoco fue alterada por concentraciones bajas de hexametonio (YOUNG y col., 1988). Esto sugiere que el efecto de la ACh sobre los receptores muscarínicos es predominante y podría ocultar la activación de estos autorreceptores nicotínicos. El estudio de los receptores nicotínicos en las arterias coronarias de resistencia sugiere la presencia de este tipo de receptores, pero no permite distinguir diferentes subtipos. Sin embargo, tanto la estimulación eléctrica como la estimulación con nicotina indican la liberación de un neurotransmisor con características que corresponden a la ACh, y además, que los efectos principales de la inervación colinérgica en estas arterias son vasoconstricción e inhibición de la vasodilatación neurogénica.

5.8 Modulación endotelial de la respuesta a la acetilcolina

La retirada mecánica de las células endoteliales en las arterias coronarias de cordero causó un incremento en la tensión basal, un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh y abolió la relajación a la sustancia P, al A23187 (**Fig. 43**) y a la bradiquinina, mientras que las respuestas al KPSS no fueron alteradas, teniendo en cuenta el incremento en el tono basal.

El inhibidor de la NO sintasa, LNNA, indujo incrementos pequeños y concentración-dependientes del tono basal de las arterias coronarias de resistencia con endotelio intacto, mientras que no tuvo efecto en preparaciones desprovistas de endotelio (**Fig. 44**). La magnitud de la respuesta máxima a la LNNA fue similar

al efecto de la retirada del endotelio. Estos resultados sugieren que los efectos inhibitorios del endotelio bajo circunstancias basales únicamente se deben a la vía de la L-arginina, y que las células endoteliales producen NO basalmente. Se ha sugerido anteriormente, que el NO derivado del endotelio y formado bajo condiciones basales tiene importancia para el tono de la circulación arterial coronaria, tanto a raíz de estudios de arterias coronarias porcinas in vitro (TSCHUDI y col., 1991; MYERS y col., 1991b), como por la observación de que la resistencia vascular coronaria basal se incrementa con la infusión in vivo de inhibidores de la NO sintasa en conejo (AMEZCU y col., 1988, 1989), perro (KELM y SCHRADER, 1990; DOMENECH y col., 1993), cabra (GARCIA y col., 1992) y cerdo (HATA y col., 1993). La inhibición de la guanilato ciclasa con azul de metileno también produjo contracciones concentración-dependientes de vasos con endotelio y la magnitud de la respuesta contráctil fue más pronunciada que la obtenida después de la inhibición de la sintasa del NO (Fig. 45). Estas contracciones fueron abolidas por la retirada mecánica del endotelio, sugiriendo que el efecto contráctil del azul de metileno es totalmente dependiente del endotelio. Aparte de una inhibición del efecto del NO basal liberado, se ha sugerido anteriormente que el efecto contráctil tan pronunciado del azul de metileno comparado con la inhibición de la NO sintasa podría ser atribuido a la contribución de un nitrovasodilatador endógeno producido por otra fuente distinta de la L-arginina (TSCHUDI y col., 1991), o a la acumulación en el endotelio, en forma de un nitrocompuesto, del NO formado a partir de la L-arginina; de esta forma, existiría un "depósito endógeno" de NO, desde donde puede ser liberado lentamente en condiciones basales. Sin embargo, otra explicación alternativa es que

el azul de metileno libere un factor contráctil del endotelio o inhiba la síntesis de PGI₂ (MARTIN y col., 1989). Sin embargo, el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina, no tuvo ningún efecto significativo sobre el tono basal en las arterias coronarias de resistencia excluyendo que parte del efecto de azul de metileno se deba a una inhibición de la síntesis de PGI₂.

De este modo, en las arterias coronarias de resistencia, el NO derivado del endotelio y formado basalmente podría reducir las respuestas a vasoconstrictores como la ACh y endotelina (BERTI y col., 1993), pero el efecto de las bajas concentraciones de pirencepina y telencepina indican que el incremento de la respuesta a la ACh se debe fundamentalmente a la liberación de EDRF inducida a través de un receptor endotelial.

La retirada del endotelio, afectó de manera diferente la respuesta a la ACh en segmentos proximales de LDA y en arterias coronarias de resistencia. En los segmentos de LDA, la retirada del endotelio no cambió la sensibilidad de las preparaciones a la ACh, pero incrementó significativamente la respuesta a concentraciones altas de ACh (3×10^{-5} - 10^{-4} M) (Fig. 46A), mientras que en las arterias coronarias de resistencia desprovistas de endotelio, la sensibilidad a la ACh fue mayor que en preparaciones con endotelio intacto (Fig. 46B). Esto sugiere que la ACh podría tener una afinidad diferente por los receptores endoteliales en las arterias coronarias grandes comparadas con las arterias coronarias de resistencia, y apoya los estudios de los receptores muscarínicos que sugieren que hay diferencias en los subtipos de receptores muscarínicos en los partes proximales y

distales de la circulación coronaria. En arterias coronarias grandes del cerdo, también se ha observado la presencia de receptores muscarínicos con baja afinidad a la ACh, que causan vasorrelajación (MATSUMOTO y col., 1993). Además, la incubación con el inhibidor de la sintasa del NO, LNNA, originó un cambio diferencial similar al de la retirada del endotelio en las curvas concentración-respuesta a la ACh en la circulación coronaria del cordero (Fig. 47). Esto sugiere que el cambio que origina la retirada del endotelio en la respuesta a la ACh, tanto en segmentos proximales de la LDA como en las arterias coronarias de resistencia, se debe a una abolición de la liberación de NO. Los resultados indican que la inhibición de la síntesis de NO tiene mayores consecuencias en las arterias coronarias de resistencia, ya que altera la respuesta a concentraciones más bajas y fisiológicas de ACh. Efectos diferenciales de la inhibición de la sintasa del NO sobre la respuesta a la ACh también se han observado en estudios in vivo realizados en el cerdo (HATA y col., 1993).

La incubación con hemoglobina o azul de metileno produjo un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh, de similar magnitud al originado por la retirada mecánica del endotelio (Fig. 48-50, Tabla 9). Esto confirma que todos los efectos inhibitorios del endotelio sobre la contracción inducida por la ACh probablemente se deban a liberación de NO. Sin embargo, en presencia de fisostigmina, los efectos de la LNNA, hemoglobina y azul de metileno sobre las curvas concentración-respuesta a la ACh fueron menores o totalmente abolidos (Fig. 47-50). El efecto de la fisostigmina no parece ser debido a una interacción directa con la vía de la L-arginina, ya que los incrementos del tono

basal en presencia de la LNNA y el azul de metileno también se observaron en preparaciones incubadas con fisostigmina. La ausencia o menor efecto observado con la LNNA, hemoglobina y azul de metileno sobre la respuesta contráctil a la ACh en presencia de fisostigmina, probablemente puede ser atribuída al mayor efecto de la ACh sobre los receptores muscarínicos del músculo liso cuando se inhibe la AChE, comparado con los receptores endoteliales. Apoyando esta hipótesis, en el presente estudio no se ha detectado AChE en la íntima de las arterias.

Las prostaglandinas no parecen participar en la respuesta contráctil a la ACh en las arterias coronarias de resistencia del cordero (Fig. 51A). Sin embargo, la incubación con el NDGA causó una inhibición pronunciada de la respuesta a la ACh (Fig. 51b). Este agente está considerado como un inhibidor potente de la enzima lipooxigenasa a concentraciones de 5 μM (FÖRSTERMANN y col., 1988), mientras que a concentraciones más altas (10 μM), también tiene un efecto sobre el EDRF después de su liberación de las células endoteliales (FÖRSTERMANN y col., 1988), y a concentraciones muy altas (36-126 μM) tiene un efecto inhibitorio directo sobre la guanilato ciclasa en el músculo liso de aorta (CLARK y LINDEN, 1986). En el presente estudio se utilizó 5 μM NDGA para obtener una inhibición específica de la vía de la lipooxigenasa, y esta concentración no alteró las relajaciones endotelio-dependientes al A23187 (Fig. 55). De este modo, a pesar de que son necesarios estudios adicionales para confirmar el último efecto, los resultados indican que la ACh induce la liberación de NO del endotelio y probablemente también de un mediador vasoconstrictor de la vía de la

lipooxigenasa.

El ionóforo de calcio, A23187, indujo relajaciones endotelio-dependientes y más potentes en los segmentos proximales de LDA que en las arterias coronarias de resistencia, y la relajación en los primeros fue más resistente a la inhibición de la sintasa del NO que la relajación de las arterias coronarias de resistencia (Fig. 52). En las arterias coronarias de resistencia, tanto la reversión de la inhibición de la NO sintasa en presencia de la L-arginina (Fig. 53), como el efecto de la hemoglobina (Fig. 54) y azul de metileno (Fig. 55) sugieren que el A23187 causa relajación de estas arterias exclusivamente a través de la liberación de NO, mientras que en los segmentos proximales de LDA, el A23187 podría liberar un factor diferente del NO (COWAN y COHEN, 1991; HASHIMOTO y col., 1993), o el NO liberado actuaría a través de un mecanismo independiente del GMPc (BOLOTINA y col., 1994).

La adición de NO exógeno (a partir de una solución acidificada de nitrito) causó una relajación de las arterias coronarias de resistencia (Fig. 56), que no se modificó por la retirada mecánica del endotelio ni por la presencia de LNNA, pero fue inhibida en presencia de el "secuestrador de NO", hemoglobina. Además, el examen histoquímico de la actividad NADPH-diaforasa demostró la presencia de esta enzima en las células endoteliales de los segmentos proximales de LDA y arterias coronarias de resistencia, mientras que no se observaron fibras nerviosas positivas para la reacción (Fig. 57). Como control positivo de la reacción se incluyero arterias peneanas de resistencia equinas, ya que en esta preparación se

observan fibras nerviosas NADPH-diaforasa positivas. De las tres isoformas de la NO sintasa (neural, endotelial y de los macrófagos), la reactividad NADPH-diaforasa se colocaliza con la inmunorreactividad para la NO sintasa neural tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, así como también en tejido no nervioso (DAWSON y col., 1991). Por tanto, la técnica histoquímica aplicada a nuestras preparaciones, puede ser considerada como un marcador fiable de los lugares de síntesis de NO en la circulación coronaria, y permiten concluir que dicha síntesis parece llevarse a cabo fundamentalmente en el endotelio vascular.

En conjunto estos resultados indican que el NO derivado del endotelio juega un papel importante en el control del tono basal de las arterias coronarias de resistencia y probablemente tiene un papel inhibitorio importante en la modulación de la respuesta contráctil a la ACh en estas arterias. Sin embargo, no parece que existan evidencias de una inervación nitrérgica en la circulación coronaria del cordero, lo cual es consistente con observaciones similares en la circulación coronaria del cerdo y del cobaya (URSELL y MAYERS, 1993; TANAKA y col., 1993a, 1993b).

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de una técnica microvascular nueva se han evaluado las respuestas funcionales de arterias coronarias de resistencia in vitro. En arterias coronarias de resistencia humanas, la respuesta a la ACh fue variable, probablemente debido a que las arterias proceden de pacientes de diferentes edades y con patologías de la circulación coronaria. Por esta razón, se ha examinado la reactividad de dichas arterias en diferentes especies, encontrando una gran variabilidad en la respuesta a la ACh. Se han elegido las arterias coronarias del cordero por su similitud con las arterias humanas en lo que respecta a las respuestas funcionales. Así, la ACh produjo contracción en todas las arterias examinadas, originando relajación únicamente en un 20% de las preparaciones.

En los segmentos arteriales de la parte proximal de la circulación coronaria se encontró una desensibilización de la respuesta contráctil a la ACh, mientras que dicha respuesta fue reproducible en las arterias coronarias de resistencia.

Tanto la actividad ChAT como la actividad AChE, fue mucho más alta en las arterias coronarias de resistencia que en segmentos proximales de la arteria coronaria izquierda descendente, pero el efecto de la inhibición de la AChE sobre las contracciones de la ACh fue similar en ambos tipos de vasos. Existen ganglios con actividad AChE en relación con las arterias coronarias grandes, y únicamente se hallaron fibras AChE-positivas en la unión adventicia-media. La inhibición de la AChE fue independiente de la presencia de endotelio.

La estimulación eléctrica transmural de las arterias coronarias de resistencia no

indujo contracción sino una relajación neurogénica que fue más pronunciada en presencia de atropina.

La baja selectividad de los agonistas muscarínicos no permitió caracterizar el subtipo de receptor muscarínico que media la contracción a la ACh en las arterias coronarias de resistencia. El orden de potencia de los antagonistas muscarínicos frente a la respuesta contráctil de la ACh fue: pFHHSiD > pirencepina > AFDX 116. El antagonista selectivo de los receptores muscarínicos M_1 , pirencepina, indujo un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh en arterias con endotelio, pero no en arterias desprovistas de endotelio. El agonista McN-A-343 produjo una relajación en arterias precontraídas que fue inhibida por la pirencepina.

La nicotina indujo un efecto contráctil en las arterias coronarias de resistencia que fue inhibido por la atropina y el hexametonio.

La retirada mecánica de endotelio, la incubación con un inhibidor de la sintasa del NO o un inhibidor de la guanilato ciclasa incrementaron el tono miogénico, indujeron un desplazamiento a la izquierda de las curvas concentración-respuesta a la ACh e inhibieron la relajación al ionóforo del calcio, A23187, en las arterias coronarias de resistencia.

De las investigaciones llevadas a cabo en el estudio de la regulación colinérgica y endotelial de la circulación coronaria de resistencia, podemos concluir lo

siguiente:

1.- Existe una desensibilización de la respuesta contráctil a la ACh en las arterias coronarias grandes o de conducción que es independiente de la presencia de endotelio y de la AChE, y que parece ser específica del receptor. Esta desensibilización a la ACh no fue hallada en las arterias coronarias de resistencia.

2.- La distribución de la actividad ChAT y de las fibras AChE-positivas en la circulación coronaria del cordero sugiere una inervación colinérgica probablemente intrínseca, con mayor densidad en las arterias de resistencia que en las partes proximales del árbol coronario.

3.- La existencia de una respuesta vasorrelajante neurogénica inducida por la estimulación eléctrica transmural y sensible a la atropina, indica que las arterias coronarias de resistencia del cordero tienen una inervación colinérgica funcional.

4.- Los valores de pK_B y el orden de potencia de los antagonistas muscarínicos en arterias sin endotelio sugiere que la contracción inducida por la ACh en arterias coronarias de resistencia del cordero está mediada por un subtipo de receptores muscarínicos M_3 .

5.- El hallazgo de que bajas concentraciones de pirenzepina desplazan a la izquierda las curvas concentración-respuesta a la ACh y de que el agonista McN-A-343 induce relajación sugiere que la respuesta contráctil de la ACh esta modulada

por un factor vasorrelajante, liberado por la activación de receptores muscarínicos M_1 en el endotelio.

6.- La nicotina tuvo un efecto contráctil en las arterias coronarias de resistencia, probablemente debido a la liberación de ACh de nervios colinérgicos. La ACh liberada parece actuar sobre receptores muscarínicos contráctiles.

7.- Los efectos de la retirada mecánica del endotelio y de los inhibidores de la vía de la L-arginina sugieren que existe una liberación basal y continua de NO y que el NO es probablemente el factor que modula la respuesta contráctil a la ACh y que media la relajación al A23187 en las arterias coronarias de resistencia. No existe ninguna indicación de que estas arterias reciban una inervación nitrérgica.

7. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, N.G., PINTO, A. y MULLANE, K.M. "Presence of cytochrome P-450-dependent monooxygenase in intimal cells of the hog aorta". *Hypertension* 7:899-904, (1985).

ADLER, M. y FILBERT, M.G. "Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function". *FEBS. Lett.* 267:107-110, (1990).

ADELSTEIN, R.S. y HATHAWAY, D.R. "Role of calcium and cyclic adenosine 3',5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction". *Am. J. cardiol.* 44:783-787, (1979).

AIMI, Y., FUJIMURA, M., VINCENT, S.R. y KIMURA, H. "Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat". *J. Comp. Neurol.* 306:382-392, (1991).

ALONSO, M.J., ARRIBAS, S., MARIN, J., BALFAGON, G. y SALAICES, M. "Presynaptic M₂-muscarinic receptors on noradrenergic nerve endings and endothelium-derived M₃ receptors in cat cerebral arteries". *Brain Res.* 567:76-82, (1991).

ALOSACHIE, I. y GODFRAIND, T. "The modulatory role of vascular endothelium in the interaction of agonists and antagonists with α -adrenoceptors in the rat aorta". *Br. J. Pharmacol.* 95:619-629, (1988).

ALTIERE, R.J., KIRITSY-ROY, J.A. y CATRAVAS, J.D. "Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A₂". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236:535-541, (1986).

AMARA, S.G., ARRIZA, J.L., LEFF, S.E., SWANSON, L.W., EVANS, R.M. y ROSENFELD, M.G. "Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide". *Science* 229:1094-1097, (1985).

AMENTA, F., FERRANTE, F. y CAVALOTTI, C. A. "Acetylcholinesterase containing nerve fibers in coronary circulation". *Cardiovasc. Res.* 15, 171-174, (1981).

AMEZCUA, J.L., DUSTING, G.J., PALMER, R.M.J. y MONCADA, S. "Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator". *Br. J. Pharmacol.* 95: 830-834, (1988).

AMEZCUA, J.L., PALMER, R.M.J., SOUZA, B.M. y MONCADA, S. "Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit". *Br. J. Pharmacol.* 97:119-1124, (1989).

ANDERSON, R., HOLMBERG, S., SVEDMYR, N. y ABERG, G. "Adrenergic alpha-and beta-receptors in coronary vessels in man. An in vitro study. *Acta Med.*

Scand. 191:241-244, (1973).

ANGUS, J.A., CAMPBELL, G.R., COCKS, T.M. y MANDERSON, J.A. "Vasodilatation by acetylcholine is endothelium-dependent: A study by sonomicrometry in canine femoral artery in vivo". J. Physiol. 344:209-222, (1983).

ANGUS, BROUGHTON, MULVANY, M.J. "Role of alpha-adrenoceptors in constrictor responses of rat, guinea-pig and rabbit small arteries to neural activation". J. Physiol. 403:495-510, (1988).

ANGUS, J.A. y COCKS, T.M. "Endothelium-derived relaxing factor". Pharmac. Ther. 41:303-315, (1989).

ANGUS, J.A., COCK, T.M., MCPHERSON, G.A. & BROUGHTON, A. "The acetylcholine paradox: a constrictor of human small coronary arteries even in presence of endothelium". Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 18:P33-36, (1991a).

ANGUS, J.A.; BROUGHTON, A. y MCPHERSON, G.A. "Membrane potential and contractility responses to acetylcholine and other vasoconstrictor stimuli in human small coronary arteries". In Resistance arteries, structure and function. Ed. M.J. Mulvany et al. Elsevier Science Publishers. pp. 255-260, (1991b).

ARUNLAKSHANA, O. y SCHILD, H.O. "Some quantitative uses of drug antagonists". Br. J. Pharmacol. 14:48-58, (1959).

ASHKENAZI, A., WINSLOW, J.W., PERALTA, E.G., PETERSON, G.L., SCHIMERLICK, M.I., CAPON, D.J. y RAMACHANDRAN, J. "A M₂ muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover". Science 238:672-675, (1987).

ASHTON, F.T., SOMLYO, A.V. y SOMLYO, A.P. "The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereoelectron microscopy". J. Molec. Biol. 98: 17-29, (1975).

AYAJIKI, K., OKAMURA, T. y TODA, N. "Nitric oxide mediates, and acetylcholine modulates, neurally induced relaxation of bovine cerebral arteries". Neuroscience 54:819-825, (1993).

BARAJAS, L. y WANG, P. "Demonstration of acetylcholinesterase in the adrenergic nerves of the renal glomerular arterioles". J. Ultrastruct. Res. 53:244-253, (1975).

BAO, J-X. "Sympathetic neuromuscular transmission in rat tail artery: a study based on electrochemical, electrophysiological and mechanical recording". Acta Physiol. Scand. 148 (suppl. 610):1-58, (1993).

BARBER, M.J., MUELLER, T.M., DAVIES, B.G. y ZIPES, D.P. "Phenol topically applied to canine left ventricular epicardium interrupts sympathetic but not vagal

afferents". *Circ. Res.* 55:532-544, (1984).

BARLOW, R.B., BERRY, K.J., GLENTON, P.A.M., NIKOLAU, N.N y SOH, K.S. "A comparison of affinity constants for muscarinic sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial and pacemaker cells at 29°C and ileum at 29°C and 37°C. *Br. J. Pharmacol.* 58:141P-142P, (1976).

BASSENGE, E. y HEUSCH, G. "Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116:77-165, (1990).

BAYLISS, G.J. y TODRICK, A. "The use of a selective acetylcholinesterase inhibitor in the stimulation of pseudo-cholinesterase activity in rat brain". *Biochem. J.* 62: 62-67, (1956).

BEASLY, D., SCHWARTZ, y BRENNER, B.M. " Interleukin-1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells". *J. Clin. Invest.* 83, 602-608, (1991).

BELL, C. "Differential effects of tetrodotoxin on sympathomimetic actions of nicotine and tyramine". *Br. J. Pharmacol.* 32:96-103, (1968).

BÉNY, J.L, BRUNET, P.C. y HUGGEL, H. "Effect of mechanical stimulation, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on the electrical and mechanical activities of circular smooth muscles from pig coronary arteries contracted with acetylcholine: role of endothelium". *Pharmacology* 33:61-68, (1986).

BÉNY, J-L. y BRUNET, P.C. "Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta" *J. Physiol.* 398: 277-289, (1988a)

BÉNY, J-L. y BRUNET, P.C. "Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries". *Blood Vessels* 25: 308-311, (1988b)

BÉNY, J-L. BRUNET, P.C. y HUGGEL, H. "Effects of substance P, calcitonin gene-related peptide and capsaicin on tension and membrane potential of pig coronary artery in vitro". *Reg. Peptides* 25:25-36, (1989).

BÉRCZI, V., GREENE, A.S., DÖRNYEI, G., CSENGÖDY, J., HÓDI, G., KÁDÁR y MONOS, E. "Venous myogenic tone: studies in human and canine vessels". *Am. J. Physiol.* 263:H315-H320, (1992).

BERNE, R.M. y RUBIO, R. "Coronary circulation" En: *Handbook of Physiology, The Cardiac System*", sec. 2, vol. 1, GEIGER, S.R. (Ed.). Washington DC, American Physiological Society, pp. 873-952, (1979).

BERRIDGE, M.J. "Inositol triphosphate and calcium signalling". *Nature* 361: 315-325, (1993).

BERTI, F., ROSSONI, G., BELLA, D.D., VILLA, L.M., BUSCHI, A., TRENTO, F., BERTI, M. y TONDO, C. "Nitric oxide and prostacyclin influence coronary vasomotor tone in perfused rabbit heart and modulate endothelin-1 activity". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 22:321-326, (1993).

BERTRAND, M.E., LABLANCHE, J.M., TILMANT, P.Y., THIEULLEUX, F.A., DELFORGE, M.R., CARRE, A.G., ASSEMAN, P., BERZIN, B., LIBERSA, C. y LAURENT, J.M. "Frequency of provoked coronary arterial spasm in 1089 consecutive patients undergoing coronary arteriography". *Circulation* 65:1299-1306, (1982).

BEVAN, J.A. y OSHER, J.V. "A direct method for recording tension changes in the wall of small blood vessels in vitro". *Agents Action* 2:257-260, (1972).

BISHOP, V.S., MALLIANI, A y THOREN, P. "Cardiac mechanoreceptors". En: *Handbook of Physiology*, SHEPHERD y ABBOUD (Ed.). American Physiological Society, Bethesda, Maryland, pp. 497-555, (1983).

BOEYNAEMS, J.M. "Drugs influencing the vascular production of prostacyclin". *Prostaglandins* 34:197-204, (1988).

BOGLE, R.G., MONCADA, S., PEARSON, J.D. y MANN, G.E. "Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter". *Br. J. Pharmacol.* 105:768-770, (1992).

BOGNAR, I.T., BEINHAEUER, B., KANN, P. y FUDER, H. "Different muscarinic receptors mediate autoinhibition of acetylcholine release and vagally-induced vasoconstriction in the rat isolated perfused heart". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341: 279-287, (1990).

BOLOTINA, V.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J. y COHEN, R.A. "Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle". *Nature* 368:850-853, (1994).

BOLTON, T.B. "Mechanisms of actions of transmitters and other substances on smooth muscle". *Physiol. Reviews* 59:606-718, (1979)

BONNER, T.I., BUCKLEY, N.J., YOUNG, A.C. y BRANN, M.R. "Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes". *Science* 237:527-532, (1987).

BONNER, T.I. "The molecular basis of muscarinic receptor diversity". *Trends Neurosci.* 12:148-151, (1989).

BRADFORD, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72: 248-254, (1976).

BRAYDEN, J.E. y BEVAN, J.A. "Neurogenic muscarinic vasodilation in the cat. An example of endothelial cell-independent cholinergic relaxation". *Circ. Res.* 56:205-211, (1985).

BRAYDEN, J.E. y LARGE, W. "Electrophysiological analysis of neurogenic vasodilation in the isolated lingual artery of the rabbit". *Br. J. Pharmacol.* 89:163-171, (1986).

BRAYDEN, J.E. "Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation". *Am. J. Physiol.* 259:H668-H673, (1990).

BRETT, D.S. y SNYDER, S.H. "Nitric oxide, a novel neuronal messenger". *Neuron* 8:3-11, (1992).

BRENNER, B.M., TROY, J. y BALLERMAN, B.J. "Endothelium-dependent vascular responses. Mediators and mechanisms". *J. Clin. Invest.* 84:1373-1378, (1989).

BRINE, F., CORNISH, E.J. y MILLER, R.C. "Effects of uptake inhibitors on responses of sheep coronary arteries to catecholamines and sympathetic nerve stimulation". *Br. J. Pharmacol.* 67:553-561, (1979).

BROTON, T.P., MIYASHIRO, J.K., MONCADA, S. y FEIGL, E. "The role of endothelium-derived relaxing factor in parasympathetic coronary vasodilatation". *Am. J. Physiol.* 262:H1579-H1584, (1992).

BROWN, A.M. "Motor innervation of the coronary arteries of the cat". *J. Physiol.* 198:311-328, (1968).

BROWN, O.M. "Cat heart acetylcholine: unilateral vagotomy studies with pyrolysis-mass fragmentography". *Life Sci.* 28:819-825, (1980).

BRUM, J.M., BOVE, A.A., SUFAN, Q., REILLY, W. y GO, V.L.W. "Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: Evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation". *J. Am. Coll. Cardiol.* 7:406-413, (1986).

BRUNING, T.A., HENDRIKS, M.G.C., CHANG, P.C., KUYPERS, E.A.P. y VAN ZWIETEN, P.A. "In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans". *Circ. Res.* 74:912-919, (1994).

BRUNKWALL, J., BERGQUIST, D. y STERNEQUIST, U. "Prostacyclin and thromboxane release from vessel wall- Comparison between an incubation and perfusion model". *Prostaglandins* 34:467-476, (1987).

BRUNNER, F., KÜHBERGER, E., SCHLOSS, J. y KUKOVETZ, W.R. "Characterization of muscarinic receptors of bovine coronary artery by functional and radioligand binding studies". *Eur. J. Pharmacol.* 196: 247-255, (1991a).

- BRUNNER, F., KÜHBERGER, E., GROSCHENER, K., PÖCH, G. y KUKOVETZ, W.R. "Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery". *Eur. J. Pharmacol.* 200: 25-33, (1991b).
- BRUSH, J.E., FAXON, D.P., SALMON, S., JACOBS, A.K. y RYAN, T.J. "Abnormal endothelium-dependent vasomotion in hypertensive patients". *J. Am. Coll. Cardiol.* 19:809-815, (1992).
- BRUTSAERT, D.L., MEULEMANS, A.L., SIPIDO, K.R. y SYS, S.U. "Effect of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle". *Circ. Res.* 62:358-66, (1988).
- BRUTSAERT, D.L. "The endocardium". *Annu. Rev. Physiol.* 51:263-71, (1989).
- BUCKLEY, N.J., BONNER, T.I., BUCKLEY, C.M. y BRANN, M.R. "Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells". *Mol. Pharmacol.* 35: 469-476, (1989).
- BÜLBRING, E. y KURIYAMA, H. "Effects of changes in external sodium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea-pig tenia coli". *J. Physiol.* 166:29-58, (1963).
- BUONASSISI, V. y VENTER, J.C. "Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:1612-1616, (1976).
- BURNSTOCK, G. "Cholinergic and purinergic regulation of blood vessels". En: *American Handbook of Physiology*", Sec. 2, vol. 2, BOHR, D.F y col. (Ed.). Washington DC, American Physiological Society, pp. 567-612, (1980).
- BURNSTOCK, G. y KENNEDY, C. "Is there basis for distinguishing two types of P₂-purinergic receptor?" *Gen. Pharmacol.* 16:433-440, (1985).
- BURNSTOCK, G. "The changing face of autonomic neurotransmission". *Acta Physiol. Scand.* 126:67-91, (1986).
- BURNSTOCK, G. "Mechanims of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems". *J. Cardiovascul. Pharmacol.* 10(suppl. 12):S74-S81, (1987).
- BURNSTOCK, G. "Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels". *Trends Pharmacol. Sci.* 9:116-117, (1988).
- BURNSTOCK, G. "Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves". *Neurochem. Int.* 17:357-368, (1990).
- BURT, A.M. "A histochemical lprocedure for the localization of choline

acetyltransferase activity". *J. Histochem. Cytochem.* 18:408-415, (1970).

BUSSE, R. FÖRSTERMANN, U. MATSUDA, H. y POHL, U. "The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia". *Pflügers Arch.* 401:77-84, (1984).

BUSSE, R.; FICHTENR, H.; LÜCKHOFF, A. y KOHLHART, M. "Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells". *Am. J. Physiol.* 255: H965-H969, (1988).

BUTCHER, L. "Acetylcholinesterase histochemistry". En: *Handbook of chemical neuroanatomy*". BJÖRKLUND, A., HÖKFELT, T. y KUHAR, H.J. (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, (1983).

BUZZARD, C.J., PFISTER, S.L. y CAMPELL, W.B. "Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A₂". *Circ. Res.* 72:1023-1034, 1993.

CAMPELL, G., GIBBINS, I.L., MORRIS, J.L., FURNESS, J.B., COSTA, M., OLIVIER, J.R., BEARDSLEY, A.M. y MURPHY, R. "Somastostatin is contained in and released from cholinergic nerves in the heart of the toad *Bufo Marinus*". *Neuroscience* 7:2012-2023, (1982).

CARR, P., GRAVES, J.E. y POSTON, L. "Carbon dioxide induced vascular relaxation in rat mesenteric arteries is endothelium dependent and mediated by nitric oxide. XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences". Glasgow 249.19/p, (1993).

CAUVIN, C. SAIDA, K. y VAN BREMEN, C. "Extracellular Ca²⁺ dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels". *Blood Vessels* 21:23-31, (1984).

CHAND, N. y ALTURA, B.M. "Endothelial cells and relaxation of vascular smooth muscle cells: possible relaxant to lipoxigenase and their significance in vascular disease". *Microcirc.* 1:297-317, (1981).

CHEN, G., PORTMAN, R., WICKEL, A. "Pharmacology of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide, a ganglionic stimulating agent". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 103:330-336, (1951).

CHEN, G.; SUZUKI, H. y WESTON, A.H. "Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels". *Br. J. Pharmacol.* 95: 1165-1174, (1988).

CHEN, G. y SUZUKI, H. "Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells". *J. Physiol.* 410: 91-106, (1989).

CHEN, G. y SUZUKI, H. "Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery". *J. Physiol.* 421: 521-534. (1990).

CHEN, G., YAMAMOTO, Y.; MIWA, K. y SUZUKI, H. "Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances". *Am. J. Physiol.* 260 (29). H1888-H1892, (1991).

CHEN, G. y CHEUNG, D.W. "Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells". *Circ. Res.* 70: 257-263, (1992).

CHESTER, A.H.; O'NEIL, G.S., ALLEN, S.P., LUU, T.N.; TADJKARIMI, S. y YACOUB, M.H. "Effect of endothelin on normal and diseased human coronary arteries". *Eur. J. Clin. Invest.* 22:210-213, (1992).

CHILIAN, W.M., LAYNE, S.M., EASTHAM, C.L. y MARCUS, M.L. "Heterogenous microvascular coronary alpha-adrenergic vasoconstriction". *Circ. Res.* 64:376-388, (1989).

CHILIAN, W.M., DELLSPERGER, K.C., LAYNE, S.M., EASTHAM, C.L., AMSTRONG, M.A., MARCUS, M.L. y HEISTAD, D.D. "Effects of atherosclerosis on the coronary microcirculation". *Am. J. Physiol.* 258:H529-H539, (1990).

CHILIAN, W.M. "Microvascular pressures and resistances in the left ventricular subepicardium and subendocardium". *Circ. Res.* 69:561-570, (1991).

CHRISTENSEN, K.L. y MULVANY, M.J. "Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats". *J. Vascl. Res.* 30:73-79, (1993).

CHU, A., CHAMBERS, D.E., LIN, C.C., KUEHL, W.D., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. y COBB, F.R. " Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs". *J. Clin. Invest.* 87: 1964-1968, (1991).

CHURCH, J. y ZOSTER, T.T. "Calcium antagonistic drugs. Mechanims of action". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58:254-264, (1980).

CLARK, D.L. y LINDEN, J. "Modulation of guanylate cyclase by lipoxygenase inhibitors". *Hypertension* 8:947-950, (1986).

COCKS, T.M. y ANGUS, J.A. "Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin ". *Nature* 305:627-630, (1983).

COCKS, T.M., ANGUS, J.A., CAMPELL, J.H. y CAMPELL, G.R. "Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 123:310-320, (1985).

COHEN, R.A., SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Prejunctional and

postjunctional actions of endogenous norepinephrine at the sympathetic neuroeffector junction in canine coronary arteries". *Circ. Res.* 52:16-25, (1983).

COHEN, R.A, SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Neurogenic cholinergic prejunctional inhibition of sympathetic beta adrenergic relaxation in the canine coronary artery". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229:417-421, (1984a).

COHEN, R.A, SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium and assymetrical responses of the coronary arterial wall". *Am. J. Pysiol.* 247:H403-408, (1984b).

COLDEN-STANFIELD, M., SCHILLING, W.P., RITCHIE, A.K., ESKIN, S.G., NAVARRO, L.T. y KUNZE, D.L. " Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells". *Circ. Res.* 61:632-640, (1987).

COOPER, A. y HEAGERTHY, A.H. "Function of human coronary microcirculation in atherosclerosis". *Circulation* 86(suppl. I), P1475, (1992).

CORR, L.A., ABERDEEN, J.A., MILLNER, P., LINCOLN, J. y BURNSTOCK, G. "Sympathetic and nonsympathetic neuropeptide Y-containing nerves in the rat myocardium and coronary arteries". *Circ. Res.* 66:1602-1609, (1990).

CORR, L. y BURNSTOCK, G. "Vasodilator response of coronary smooth muscle to the sympathetic co-transmitters noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate". *Br. J. Pharmacol.* 104:337-342, (1991).

COSTA, M. y MAJEWSKI, H. "Evidence for facilitatory and inhibitory muscarinic receptors on postganglionic sympathetic nerves in mouse isolated atria". *Br. J. Pharmacol.* 102:855-860, (1991).

COWAN, C.L. y McKENZIE, J.E. "Cholinergic regulation of resting coronary blood flow in domestic swine". *Am. J. Physiol.* 259: H109-H115, (1990).

COWAN, C.L. y COHEN, R.A. "Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent reponses". *Am. J. Physiol.* 261:H830-H835, (1991).

CRISWELL, M.H. y BRANDON, C. "Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase localization patterns do correspond in cat and rat retinas". *Vision Res.* 33:1747-1753, (1993).

CUELLO, A.C. y SOFRONIEW, M.V. "The anatomy of the CNS cholinergic neurons". *TINS* 7:74-79, (1984).

DALE, H.H. "The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6:147-190, (1914).

DALSGAARD, C.-J., FRANCO-CERECEDA, A., SARIA, A., LUNDBERG, J.M. THEODORSSON-NORHEIM, E. y HÖKFELT, T. "Distribution and origin of substance P-and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea pig heart". *Cell. Tiss. Res.* 243:477-485, (1986).

DASHWOOD, M.R., SYJES, R.M., MUDDLE, J.R., COLLINS, M.J., PRHAR, S. THEODOROPOULOS, S. y YACOUB, M.H. "Autoradiographic localization of [¹²⁵I]endothelin binding sites in human blood vessels and coronary tissue: functional correlates". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17(suppl. 7):S458-S462, (1991).

DAUPHIN, F. y HAMEL, E. "Muscarinic receptor subtype mediating vasodilatation in feline middle cerebral artery exhibits M₃ pharmacology". *Eur. J. Pharmacol.* 178:203-213, (1990).

DAWSON, T.M., BREDT, D.S, FORTHI, M., HWANG, P.M. y SNYDER, S.H. "Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues". *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88:7797-7801, (1991).

DE NEEF, ROBBERECHT, P., CHATELEIN, P., WAELBROECK, M. y CHRISTOPHE, J. "The in vitro chronotropic and inotropic effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the atria and ventricular papillary muscle from cynomolgus monkey heart". *Reg. Pep.* 8:237-244, (1984).

DEES, J.A., MASTER, B.S.S. y MULLER-EBERHARD, U. "Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and phenobarbital on the occurrence and distribution of four cytochrome P-450 isoenzymes in rabbit kidney, lung and liver. *Cancer Res.* 42:1423-32, (1982).

DELANEROLLE, P., NISHIKAWA, M., YOST, D.A. Y ADELSTEIN, R.S. "Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle". *Science* 223:1415-1417, (1984).

DELLA, N.G, PAPKA, R.E., FURNESS, J.B. y COSTA, M. "Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pigs. *Neuroscience* 9:605-619, (1983).

DELMENDO, R.E., MICHEL, A.D. y WHITING, R.L. "Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites". *Br. J. Pharmacol.* 96:457-464, (1989).

DEMEY, J.G. y VANHOUTTE, P.M. "Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium". *Circ. Res.* 51:439-447, (1982).

DENN, M.J. y STONE, H.L. "Autonomic innervation of dog coronary arteries". *J. Appl. Physiol.* 41: 30-35, (1976).

DIEZ, J., TAMARGO, J. y VALENZUELA, C. "Negative inotropic effect of

somatostatin in guinea-pig atrial fibers". *Br. J. Pharmacol.* 86:547-555, (1985).

DILLON, P.F., AKSOY, M.O., DRISKA, S.P. y MURPHY, R.A. " Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle". *Science* 211:495-497, (1981)

DISALVO, J., GIFFORD, D., BIALOJAN, C. y RÜEGG, J.C. "An aortic spontaneously phosphatase desphosphorylates myosin and inhibits actin-myosin interaction". *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 11:906-911, (1983).

DOLEZEL, S., GEROVA, M., GERO, J., SLADEK, T. y VASKU, J. "Adrenergic innervation of the coronary arteries and the myocardium". *Acta Anat.* 100:306-316, (1978).

DOMENECH, R., MACHO, P., PENNA, M., SCHWARZE, H., HUIDO-TORO, J.P. y THUMALA, A. "Role of endothelium-derived relaxing factor on coronary blood flow regulation in the dog". *Eur. J. Pharmacol.* 238:53-58, (1993).

DOWNEY, H.F., BASHOUR, C.A., BOUTROS, I.S., BASHOUR, F.A. y PARKER, P.E. "Regional myocardial blood flow during nicotinic infusion: Effects of beta adrenergic blockade and acute coronary artery occlusion". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202:55-68, (1977).

DOWNEY, J.M. "The extravascular coronary resistance". En: KALSNER, S. (Ed.) "The coronary artery". Croom Helm, London and Canberra, pp. 268-291, (1982).

DRAZIN, M.B., RAPOPORT, R.M. y MURAD, F. "Myosin light chain dephosphorylation in intact rat thoracic aorta treated with sodium nitroprusside; role of cyclic GMP". *Clin. Res.* 31:466-467, (1983).

DUCKLES, S.P., YAMAMURA, H.I. y LEE, V. "AFDX 116 discriminates between muscarinic M₂ receptors of the heart and the vasculature". *Life Sci.* 40:1507-1511, (1987).

DUCKLES, S.P. "Vascular muscarinic receptors: Pharmacological characterization in the bovine coronary artery". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246:929-934, (1988).

DUCKLES, S.P. y GARCIA-VILLALON, A.L. "Characterization of vascular muscarinic receptors: Rabbit ear artery and bovine coronary artery". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:608-613, (1990).

DUCKLES, S.P. "p-Fluoro-hexahydro-sila-difenidol: affinity for vascular muscarinic receptors". *Eur. J. Pharmacol.* 185:227-230, (1990).

ECKENSTEIN, F. y BAUGHMAN, R.W. "Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide". *Nature* 309:153-155, (1984).

ECKMAN, D.M.; FRANKOVICH, J.D. y KEEF, K.D. "Comparison of the actions of acetylcholine and BRL 38227 in the guinea-pig coronary artery". *Br. J. Pharmacol.* x: 9-16, (1992).

EDLUND, A., BERGLUND, B., VAN DORNE, D., KAIJSER, L., NOWAK, J., PATRONO, C., SOLLEVI, A. y WENNMALM, A. "Coronary flow regulation on patients with ischaemic heart disease: release of purines and prostacyclin and the effect of inhibitors of prostacyclin formation. *Circulation* 71:1113-1120, (1985).

EGLME, C., GODFRAIND, T. y MILLER, R.C. "Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 81: 16-18, (1984).

EGLIN, R.M. y WHITING, R.L. "Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilatation". *Br. J. Pharmacol.* 84:3-5, (1985)

EGLIN, R.M. y WHITING, R.L. "Muscarinic receptor subtypes: a critique of the current classification and a proposal for a working nomenclature". *J. Auton. Pharmacol.* 5:323-346, (1986).

EGLIN, R.M., KENNEY, B.A., MICHEL, A.D. y WHITING, R.L. "Muscarinic activity of McN-A-343 and its value in muscarinic receptor classification". *Br. J. Pharmacol.* 90:693-700, (1987).

EGLIN, R.M., MICHEL, A.D., CORNETT, C.M., KUNYSZ, E.A. y WHITING, R.L. "The interaction of hexamethonium with muscarinic receptor subtypes in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 98:499-506, (1989).

EGLIN, R.M., MICHEL, A.D., MONTGOMERY, W.W., KUNYSZ, E.A., MACHADO, C.A. y WHITING, R.L. "The interaction of parafluorohexahydrosilaphenidol at muscarinic receptors in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 99:637-642, (1990).

ELLISON, J.P. y HIBBS, R.G. "An ultrastructural study of mammalian cardiac ganglia". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 8: 89-101, (1976).

ENDO, M., HIROSHAWA, K., KANEKO, N., HASE, K., INOUE, Y. y KONNO, S. "Prinzmetal's variant angina. Coronary arteriogram and left ventriculogram during angina attack induced by methacholine". *N. Eng. J. Med.* 194:252-255, (1976).

ENTZEROTH, M., DOODS, H.N. y MAYER, N. "Characterization of porcine coronary muscarinic receptors". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341: 432-438, (1990).

ERZA, D., LAURINDO, F.R.M., EIMERL, J., GOLDSTEIN, R.E., PECK, C.C. y FEUERSTEIN, G. "Tachykinin modulation of coronary blood flow". *Eur. J. Pharmacol.* 122:135-138, (1986).

- ESTRADA, C., TRIGUERO, D., MUÑOZ, J. y SUREDA, A. "Acetylcholinesterase-containing fibers and choline acetyltransferase activity in isolated cerebral microvessels from goats". *Brain Res.* 453:275-280, (1988).
- EVERS, A.S., MURPHREE, S., SAFFITZ, J.E., JAKSCHIK, B.A. y NEEDLEMAN, P. "Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxane and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction". *J. Clin. Invest.* 75:992-999, (1985).
- FALCK, B., MCHEDLISHVILI, G.I. y OWMAN, C. "Histochemical demonstration of adrenergic nerves in cortex-pia of rabbit". *Acta Pharmacol. Toxicol.* 23:133-142, (1965).
- FAULER, J. y FRÖHLICH, J.C. "Cardiovascular effects of leukotrienes". *Cardiovasc. Drugs Ther.* 3:499-505, (1989).
- FEIGL, E. "Coronary physiology". *Physiological Reviews* 63:1-205, (1983).
- FEIGL, E.O. "Coronary circulation". En: "Textbook of physiology" Ed. PATTON, (1989).
- FEIGL, E.O. "Sympathetic control of coronary circulation". *Circ. Res.* 20:262-277, (1967).
- FEIGL, E.O. "Parasympathetic control of coronary blood flow in dogs". *Circ. Res.* 25: 509-519, (1969).
- FEIGL, E.O. "Reflex parasympathetic coronary vasodilation elicited from cardiac receptors in the dog". *Circ. Res.* 37:175-182, (1975).
- FELETOU, M. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle". *Br. J. Pharmacol.* 93: 515-524, (1988).
- FELETOU, M. y VANHOUTTE, P.M. "Tetrodotoxin-insensitive relaxation of coronary arterial smooth muscle to electrical stimulation: possible involvement of a dopaminergic mechanism". *Blood Vessels* 26:213-227, (1989).
- FERRER, M., GALVAN, R., MARIN, J. y BALFAGON, G. "Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the inhibition of acetylcholine and noradrenaline release in bovine cerebral arteries". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 345:619-626, (1992).
- FLECKENSTEIN, A. "Calcium antagonism in heart and smooth muscle". A Wiley-Interscience Publication, New York, pp.209-321, (1983).
- FLEMING, I., GRAY, G.A. y STOCLET, J.-C. "Influence of endothelium on induction of the L-arginine-nitric oxide pathway in rat aortas". *Am. J. Physiol.* 264:H1200-1207, (1993).

FISHER, J.A. y BRON, W. "Calcitonin gene products: evolution, expression and biological targets". *Bone Min.* 2:347-359, (1987).

FORNUM, F. "A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase". *J. Neurochem.* 24:407-409, (1975).

FORSMANN, W.G., TRIEPEL, J., DAFFNER, C., HEYM, C., CUEVAS, P., NOBLE, M.I.M. y YANAIHARA, N. "Vasoactive intestinal peptide in the heart". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527:405, (1988).

FÖRSTERMANN, U., MÜGGE, A. y FRÖHLICH, J.C. "Endothelium-dependent relaxation of human epicardial coronary arteries: frequent lack of effect of acetylcholine". *Eur. J. Pharmacol.* 128:277-281, (1986).

FÖRSTERMANN, U., ALHEID, U., FRÖHLICH, J.C. y MÜLSCH, A. "Mechanisms of action of lipoxygenase and cytochrome P-450-mono-oxygenase inhibitors in blocking endothelium-dependent vasodilatation". *Br. J. Pharmacol.* 93:569-578, (1988).

FRANCO-CERECEDA, A. y LUNDBERG, J.M. "Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of heart contractile rate and force". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 331:146-151, (1985).

FRANCO-CERECEDA, A. y LUNDBERG, J.M. y DAHLÖF, C. "Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone". *Acta Physiol. Scand.* 124:361-369, (1985).

FRANCO-CERECEDA, A., LUNDBERG, J.M. y HÖKFELT, T. "Somatostatin: an inhibitory parasympathetic transmitter in the human heart". *Eur. J. Pharmacol.* 132:101-102, (1986).

FRANCO-CERECEDA, A., BENGTSON, L. y LUNDBERG, J.M. "Inotropic effects of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on the human right atrium in vitro". *Eur. J. Pharmacol.* 134:69-76, (1987a).

FRANCO-CERECEDA, A., RUDEHILL, A. y LUNDBERG, J.M. "Calcitonin gene-related peptide but not substance P mimics capsaicin-induced coronary vasodilatation in the pig". *Eur. J. Pharmacol.* 142:235-243, (1987b).

FRANCO-CERECEDA, A., LUNDBERG, J.M., SARIA, A., SCHREIBMAYER, W. y TRITTHART, H.A. "Calcitonin gene-related peptide: release by capsaicin and prolongation of the action potential in the guinea-pig heart". *Acta Physiol. Scand.* 132:181-192, (1988).

FRANCO-CERECEDA, A., SARIA, A. y LUNDBERG, J.M. "Differential release of calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y from the isolated heart by capsaicin, ischaemia, nicotine, bradykinin and ouabain". *Acta Physiol. Scand.*

135:173-187, (1989).

FRANCO-CERECEDA, A. y RUDEHILL, A. "Capsaicin-induced vasodilation of human coronary arteries in vitro is mediated by calcitonin gene-related peptide rather than substance P or neurokinin A". *Acta Physiol. Scand.* 136:575-580, (1989).

FRANCO-CERECEDA, A. "Endothelin- and neuropeptide Y-induced vasoconstriction of human epicardial coronary arteries in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 97:968-972, (1989).

FRANCO-CERECEDA, A. "Calcitonin gene-related peptide and human epicardial coronary arteries. presence, release and vasodilator effects ". *Br. J. Pharmacol.* 102:506-510, (1991).

FUDER, H., KILBINGER, H. y MULLER, M. "Organ selectivity of hexahydrosiladifenidol in blocking pre-and postjunctional muscarinic receptors studied in the guinea pig ileum and rat heart". *Eur. J. Pharmacol.* 113:125-127, (1985).

FUJI, K., HEISTAD, D. y FARACI, F. "Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo". *Circ. Res.* 69:697-705, (1991).

FUJINO, K., NAKAYA, S., WAKATSUKI, T., MIOYOSHI, Y., NAKAYA, Y., MORI, H. y INOUE, L. "Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca^{2+} -activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256:371-377, (1991).

FUNAKI, S. y BOHR, D.F. "Electrical and mechanical activity of isolated vascular smooth muscle of the rat". *Nature* 203, 192-194, (1964).

FURCHGOTT, R.F. y ZAWADZKI, J.V. "The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, (1980).

FURCHGOTT, R.F. "The role of the endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:175-197, (1984).

FURCHGOTT, R.F. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-derived relaxing and contracting factors". *Faseb. J.* 3:2007-2018, (1989).

FURUKAWA, K-I., TAWADA, Y. y SHIGEKAWA, M. "Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells". *J. Biol. Chem.* 263:8058-8065, (1988).

FURUSHO, N., ARAKI, H., SAKAINO, N., NISHI, K. & MIYAUCHI, Y. "Effects of perivascular nerve stimulation on the flow rate in isolated epicardial coronary arteries of pigs". *Eur. J. Pharmacol.* 154:79-84, (1988).

GALLE, J., BASSENGE, E. y BUSSE, R. "Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictors to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle". *Circ. Res.* 66:1287-1293, (1990).

GANTZOS, R.D., EBEIGBE, A.B. y WEEB, R.C. " Ca^{2+} , histamine antagonists and relaxation to electrical impulses in dog coronary artery". *Eur. J. Pharmacol.* 89:287-291, (1983).

GARLAND, C.J. y MCPHERSON, G.A. "Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery". *Br. J. Pharmacol.* 105: 429-435, (1992).

GARCIA, J.L., FERNANDEZ, N., GARCIA-VILLALON, A.L., MONGE, L., GOMEZ, B. y DIEGUEZ, G. " Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the goat coronary circulation under basal conditions and after vasodilator stimulation". *Br. J. Pharmacol.* 106:563-567, (1992).

GARCIA-VILLALON, A.L., KRAUSE, D.N., EHLERT, F.J. y DUCKLES, S.P. "Heterogeneity of muscarinic receptors subtypes in cerebral blood vessels". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:304-310, (1991).

GARDINER, S.M., COMPTON, A.M., BENNETT, T., PALMER, R.M.J. y MONCADA, S. "Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide". *Hypertension* 15:486-492, (1990)

GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L. y CHESS-WILLIAMS, R. "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388, (1988).

GEROVA, M., DOLEZEI, S., GERO, J. y BARTA, E. "Role of vagus in control of the major conduit coronary artery in the dog". *Physiol. Bohemoslov.* 28: 299-307, (1979).

GEROVA, M. Conduit coronary artery: Control by autonomic nervous system. *NIPS* 6:103-107, (1991).

GERRITSEN, M.E. y CHELI, C.D. "Arachidonic acid prostaglandin endoperoxide metabolism in isolated rabbit and coronary microvessels and isolated and cultivated coronary microvessel endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 72:1658-1671, (1983).

GIACHETTI, A., MICHELETTI, R. y MONTAGNA, E. "Cardioselective profile of AFDX 116, a muscarine M_2 receptor antagonist". *Lif Sci.* 38:1163-1672, (1986).

GIBBINS, I.L., FURNESS, J.B., COSTA, M., MACINTYRE, I., HILLYARD, C.J. y GIRGIS, S. " Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea-pig". *Neurosci. Lett.* 57:125-130, (1985).

GILLESPIE, M.N., OWASOYO, J.O., MCMURTRY, I.F. y OBRIEN, R.F. "Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236:339-343, (1986).

GINSBURG, R., BRISTOW, M.R., HARRISON, D.C. y STINSON, E.B. "Studies with isolated human coronary arteries. Some general observations, potential mediators of spasm, role of calcium antagonists". *Chest* 78(suppl.):180-186, (1980).

GODFRAIND, T. "Evidence for heterogeneity of endothelin receptor distribution in human coronary artery". *Br. J. Pharmacol.* 110:1201-1235, (1993).

GOLDSMITH, J.C. "Contribution of the subendothelium to prostacyclin release after vascular injury". *J. Lab. Clin. Med.* 100:574-584, (1982).

GONG, M.C. COHEN, P., KITAZAWA, T., IKEBE, M., MASUO, M., SOMLYO, A.P. y SOMLYO, A. "Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle". *J. Biol. Chem.* 267:14662-14668, (1992).

GONZALEZ, M.F., SHARP, F.R. y SAGAR, S.M. "Axotomy increases NADPH-diaphorase staining in rat vagal motor neurons". *Brain Res Bull.* 18:417-427, (1987).

GORDON, J.L. y MARTIN, W. "Endothelial-dependent relaxation of the pig aorta: Relationship to stimulation of rubidium efflux from isolated endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 79:531-541, (1983).

GORDON, J.B., GANZ, P., NABEL, E.G., FISH, D., ZEBEDE, J., MUDGE, G.H., ALEXANDER, R.W. y SELWYN, A.P. "Atherosclerosis influences the vasomotor response of epicardial coronary arteries to exercise". *J. Clin. Invest.* 83:1946-1952, (1989).

GORMAN, R.R., BUNTING, S. y MILLER, O.V. "Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX)". *Prostaglandins* 13:377-388, (1977).

GOULD, K.L., LIPSCOMB, K. y HAMILTON, G.W. "Physiologic basis for assessing critical coronary stenosis. instantaneous flow response and regional distribution during coronary hyperemia as measures of coronary flow reserve". *Am. J. Cardiol.* 33:87-94, (1974).

GRÄSER, T., LEISNER, H. y TIEDT, N. "Absence of role of endothelium in the response of isolated porcine coronary arteries to acetylcholine". *Cardiovascl. Res.* 20:299-302, (1986).

GREENBERG, S. y TANAKA, T.P. "Mechanism of acetylcholine-mediated relaxation of canine mesenteric arteries". *Fed. Proc.* 41:427, (1982).

GREENBERG, B., RHODEN, K. y BARNES, P. "Calcitonin gene-related peptide

(CGRP) is a potent non-endothelium-dependent inhibitor of coronary vasomotor tone". Br. J. Pharmacol. 92:789-794, (1987).

GREENBERG, S. y DIECKE, F.P.J. "Endothelium-derived relaxing and contracting factors. New concepts and new findings. Drug Development Research 12:131-149, (1988).

GRIFFITH, T.M., EDWARDS, D.H., LEWIS, M.J., NEWBY, A.C. y HENDERSON, A.H. "Production of endothelium-derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium-ion. Cardiovascl. Res. 20:7-12, (1986).

GROSS, G.J., BUCK, J.D. y WARLTIER, D.C. "Transmural blood flow during activation of coronary muscarinic receptors". Am. J. Physiol. 240: H941-H946, (1981).

GROVER, A.K. y KWAN, C.Y. "Ca²⁺-handling properties of microsomal subfractions of rat vas deferens smooth muscle". Can. J. Physiol. Pharmacol. 62:76-79, (1984).

GROZDANOVITZ, Z., BAUMGARTEN, H.G. y BRÜNING, G. "Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthetase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse". Neurosci. 48:225-335, (1992).

GRUETTER, C.A., KADOWITZ, P.J. y IGNARRO, L.J. "Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite and amyl nitrite. Can. J. Physiol. Pharmacol. 59: 150-156, (1981a).

GRUETTER, C.A., GRUETTER, D.Y., LYON, J.E., KADOWITZ, P.J. y IGNARRO, L.J. "Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin". J. Pharmacol. Exp. Ther. 219:181-186, (1981b).

GU, J., POLAK, J.M., ADRIAN, T.E., ALLEN, J.M., TATEMOTO, K. y BLOOM, S.R. "Neuropeptide tyrosine (NPY)- a major new cardiac neuropeptide". Lancet 2:1008-1010, (1983).

GULBENKIAN, S., WHARTON, J. y POLAK, J.M. "The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using antiserum to protein gene product 9.5 (PCG 9.5)". J. Auton. Nerv. Syst. 18:235-247, (1987).

GULBENKIAN, S., EDVINSSON, L., OPGAARD, S., WHARTON, J., POLAK, J.M. y DAVID-FERREIRA, J.F. "Peptide-containing nerve fibers in guinea-pig coronary arteries: immunohistochemistry, ultrastructure and vasomotility". J. Auton. Nerv. Syst. 31:153-168, (1990).

GULBENKIAN, S., EDVINSSON, L., OPGAARD, S., VALENCA, A.,

WHARTON, J. y POLAK, J.M. "Neuropeptide Y modulates the action of vasodilator agents in guinea-pig epicardial coronary arteries". *Reg. Peptides* 40:351-362, (1992).

GULBENKIAN, S., OPGAARD, S., EKMAN, R., ANDRADE, C., WHARTON, J., POLAK, J.M., QUEIROZ e MELO, J. y EDVINSSON, L. "Peptidergic innervation of human epicardial coronary arteries". *Circ. Res.* 73:579-588, (1993).

HACKETT, J.G., ABOUD, F.M., MARK, A.L., SCHMID, P.G. y HEISTAD, D.D. "Coronary vascular responses to stimulation of chemoreceptors and baroreceptors. Evidence for reflex activation of vagal cholinergic innervation". *Circ. Res.* 31: 8-17, (1972).

HAI, C.M. y MURPHY, R.A. "Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle". *Am. J. Physiol.* 254:C99-C106, (1988).

HALPERN, W. "Common in vitro investigative methods". In: "The resistance vasculature". Ed. BEVAN, J.A., HALPERN, W. y MULVANY, M.J. Humana Press, New Jersey, (1991).

HAMEL, E., ASSUMEL-LURDIN, C., EDVINSSON, L., FAGE, D. y MACKENZIE, E.T. "Neuronal versus endothelial origin of vasoactive acetylcholine in pial vessels". *Brain Res.* 420:391-396, (1987).

HAMMER, R., BERRIE, C.P., BIRDSALL, N.J.M., BURGEM, A.S.V. y HULME, E.C. "Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors". *Nature* 283:90-92, (1980).

HAMMER, R. y GIACHETTI, A. "Muscarinic receptor subtypes: M₁ and M₂ biochemical and functional characterization". *Life Sci.* 31: 2991-2998, (1982).

HAN, C. y ABEL, P.W. "Neuropeptide Y potentiates contraction and inhibits relaxation of rabbit coronary arteries". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9:675-681, (1987).

HARTSHORNE, D.J. "Biochemistry of the contractile process in smooth muscle". En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed. Johnson, L.R., Raven Press, NY p.423-482, (1987).

HASHIMOTO, M., CLOSE, L.A., ISHIDA, Y. y PAUL, R.J. "Dependence of endothelium-mediated relaxation on oxygen and metabolism in porcine coronary arteries". *Am J. Physiol.* 265:H299-H306, (1993).

HASHIMOTO, M., ISHIDA, Y., SAKAMURA, I., TANAKA, Y. y MASUMURA, S. "Notes on the acetylcholine-induced relaxation of porcine coronary arteries". *Life Sci.* 54:525-531, (1994).

HATA, H., EGASHIRA, K., FUKAI, T., OHARA, Y., KASUYA, H., TAKAHASHI, T. y TAKESHITA, A. "The role of endothelium-derived nitric oxide

in acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in closed-chest pigs". *Coronary Artery Disease* 4:891-898, (1993).

HENDRIKS, M.G.C., PFAFFENDORF, M. y VAN ZWIETEN, P.A. "Characterization of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilation in the rat perfused mesenteric vascular bed preparation". *J. Auton. Pharmacol.* 12:411-420, (1992).

HERNANDEZ, M., SIMONSEN, U., PRIETO, D., RIVERA, L., GARCIA, P., ORDAZ, E. y GARCIA-SACRISTAN, A. "Different muscarinic receptor subtypes mediating the phasic activity and basal tone of pig isolated intravesical ureter". *Br. J. Pharmacol.* 110:1413-1420, (1993).

HICKEY, K.A., RUBANYI, G.M., PUAL, R. y HIGHSMITH, R.F. "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells". *Am. J. Physiol.* 248:C550-C556, (1985).

HIMPENS, B. y SOMLYO, A.P. "Free-calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle". *J. Physiol.* 395:507-530, (1988).

HIRSCH, E.F. y BORGHARD-ERDLE, A.M. "The innervation of the human heart. I. The coronary arteries and the myocardium". *Arch. Pathol.* 71: 384-407, (1961).

HIRST, G.D.S. "Neuromuscular transmission in arterioles of guinea-pig submucosa". *J. Physiol.* 273:263-275, (1977).

HIRST, G.D.S. y NEILD, T.O. "Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle". *Nature* 283:767-768, (1980).

HIRST, G.D.S., SILVERBERG, G.D. y VANHELDEN, D.F. "The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles". *J. Physiol.* 371:289-304, (1986).

HIRST, G.D.S. y EDWARDS, F.R. "Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles". *Physiol. Rev.* 69:546-604, (1989).

HISHINUMA, S., MATSUMOTO, Y. UCHIDA, M.K. y KUROKAWA, M. "Novel regulation of muscarinic receptors and their coupling with G proteins in smooth muscle: transient resensitization during desensitizing process". *Br. J. Pharmacol.* 109:330-335, (1993).

HODGSON, J. y MARSHALL, J.J. "Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation. Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with non-stenotic coronary arteries". *Circulation* 79: 1043-1051, (1989).

HÖGESTATT, E.D. y ANDERSON, K.E. "Mechanical properties of rat cerebral arteries as studied by a sensitive device for recording of mechanical activity in isolated small blood vessels". *Acta Physiol. Scand.* 117:49-61, (1983).

HÖKFELT, T., MILLHORN, D., SEROOGY, K., TSURUO, Y., CECCATELLI, S., LINH, B., MEISTER, B., MELANDER, T., SCAHLLING, M., BARTFAI, T. y TERENIUS, L. "Coexistence of peptides with classical neurotransmitters". En: *Regulatory peptides*. Ed. POLAK, J.M. Birkhäuser Verlag, Basel, (1989).

HOLMAN, J.J., CRAIG, R.G. y MARSHALL, I. "Human alpha-and beta-CGRP and rat alpha-CGRP are coronary vasodilators in the rat". *Peptides* 7:231-235, (1986).

HOLMAN, M.E. "Membrane potentials recorded with high-resistance micro-electrodes, and the effects of changes in ionic environment on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle of the tenia coli of the guinea-pig". *J. Physiol.* 141:464-488, (1958).

HOLMGREN, S., ABRAHAMSSON, T. y ALMGREN, O. "Adrenergic innervation of coronary arteries and ventricular myocardium in the pig: fluorescence microscopic appearance in the normal state and after ischaemia". *Basic Res. Cardiol.* 80:18-26, (1985).

HOLTZ, J., MAYER, E. y BASSENGE, E. "Demonstration of alpha-adrenergic coronary control in different layers of canine myocardium by regional myocardial sympathectomy". *Plügers Arch.* 372:187-194, (1977).

HOLTZ, J., FÖRSTERMANN, U., POHL, U., GIESLER, M. y BASSENGE, E. "Flow-dependent, endothelium-mediated dilatation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects on cyclooxygenase inhibition". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6:1161-1169, (1984).

HOLZMAN, S. "Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips". *J. Cyclic Nucleotide Res.* 8:409-419, (1982).

HOPWOOD, A.M. y BURSNTOCK, G. "ATP mediates coronary vasoconstriction via P_{2x}-purinoceptors and coronary vasodilatation via P_y-purinoceptors in the isolated perfused rat heart". *Eur. J. Pharmacol.* 136:49-54, (1987).

HOOVER, D.B. "Effects of capsaicin on release of substance P-like immunoreactivity and physiological parameters in isolated perfused guinea-pig heart". *Eur. J. Pharmacol.* 141:489-192, (1987).

HOPE, B.T. y VINCENT, S.R. "Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase". *J. Histochem. Cytochem.* 37:653-661, (1989).

HORIO, Y., YASUE, H., ROKUTANDA, M., NAKAMURA, N., OGAWA, H.,

TAKAOKA, K., MATSUYAMA, K. y KIMURA, T. "Effects of intracoronary injection of acetylcholine on coronary arterial diameter". *Am. J. Cardiol.* 57:984-989, (1986).

HOUSTON, D.A., BURNSTOCK, G. y VANHOUTTE, P.M. "Different P₂-purinergic receptor subtypes of endothelium and smooth muscle in canine blood vessels". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:501-506, (1987).

HU, J. y EL-FAKAHANY, E.E. "Role of intercellular and intracellular communication by nitric oxide in coupling of muscarinic receptors to activation of guanylate cyclase in neuronal cells". *J. Neurochem.* 61:578-585, (1993).

HUANG, A.H.; BUSSE, R. y BASSENGE, E. "Endothelium dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide)". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 338: 438-442, (1988).

HUANG, M., SHIRAHASE, H. y RORSTAD, O.P. "Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP ". *Peptides* 14:755-762, (1993).

HULME, E.C., BIRDSALL, N.J.M. y BUCKLEY, N.J. "Muscarinic receptor subtypes". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 633-73 (1990).

HUMPHRIES, R.G., CARR, R.D., NICOL, A.K., TOMLISON, W. y O'CONNOR, S.E. " Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N^G-nitro-arginine". *Br. J. Pharmacol.* 102:565-566, (1991).

IGNARRO, J.L. y KADOWITZ, P.J. "The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 25: 171-191, (1985).

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. y CHAUDHURI, G. "Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) produced and released from artery and veins is nitric oxide". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9265-9269, (1987).

IGNARRO, L.J. "Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:535-560, (1990).

IINO, M. "Calcium release mechanisms in smooth muscle". *Jpn. J. Pharmacol.* 54:345-354, (1990).

IKUSHIMA, S., MURAMATSU, I. y FUJIWARA, M. "Effects of 4-aminopyridine on the adrenergic nerve terminals of rabbit arteries". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219:792-797, (1981).

IKUSHIMA, S., MURAMATSU, I., SAKAKIBARA, Y., YOKOTANI, K. y FUJIWARA, M. "The effects of d-nicotine and l-isomer on nicotinic receptors". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222:463-470, (1982).

ILLIANO, S., NAGAO, T. y VANHOUTTE, P.M. "Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery". *Br.J. Pharmacol.* 107: 387-392, (1992).

INGERMAN-WOJENSKI, C., SILVER, M.J., SMITH, J.B. y MACARAK, E. "Bovine endothelial cells in culture produce thromboxane as well as prostacyclin. *J. Clin. Invest.* 67:1292-1296, (1981).

INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K., MASAKI, T. "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: 86:2863-2867, (1989).

ITO, B.R. y FEIGL, E.O. "Carotid chemoreceptor reflex and parasympathic coronary vasodilatation in the dog". *Am. J. Physiol.* 249:H167-H1176, (1985).

ITO, Y., KITAMURA, K. y KURIYAMA, H. "Effects of acetylcholine and catecholamines on the smooth muscle cell of the porcine coronary artery". *J. Physiol.* 294. 595-611, (1979).

ITOH, T.; KAJIWARA, M.; KITAMURA, K. y KURIYAMA, H. "Roles of stored calcium on the mechanical response evoked in smooth muscle cells of the porcine coronary artery". *J. Physiol.* 322: 107-125, (1982).

ITOH, T., KANMURA, Y. y KURIYAMA, H. "A23187 increases calcium permeability of store sites more than of surface membranes in the rabbit mesenteric artery". *J. Physiol.* 359:467-484, (1985).

ITOH, T., KUBOTA, Y. y KURIYAMA, H. "Effects of a phorbol ester on acetylcholine-induced Ca^{2+} mobilization and contraction in the porcine coronary artery". *J. Physiol.* 397:401-419, (1988).

ITOH, H., LEDERIS, K.P y RORSTAD, O.P. "Relaxation of isolated coronary arteries by vasoactive intestinal peptide". *Eur. J. Pharmacol.* 181:199-205, (1990).

JACOBOVITZ, D. "Histochemical studies of the relationship of chromaffin cells and adrenergic nerve fibers to the cardiac ganglia of several species". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 158, 227-240, (1967).

JAIWAL, N. y MALIK, K.U. " Prostaglandin synthesis elicited by cholinergic stimuli is mediated by activation of M_2 muscarinic receptors in rabbit heart". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:59-66, (1988).

JAIWAL, N., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. y MALIK, K.U. " Contribution of $M_{2\alpha}$ and $M_{2\beta}$ muscarinic receptors to the action of cholinergic stimuli on prostaglandin synthesis and mechanical function in the isolated rabbit heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 104-113, (1988).

JAISSWAL, N. y MALIK, K.U. " Methoctramine, a cardioselective antagonist: muscarinic receptor mediating prostalandin synthesis in isolated rabbit heart". *Eur. J. Pharmacol.* 192:63-70, (1991).

JENSEN, P.E., HUGHES, A.H., BOONEN, H.C. y AALKJAER, C. "Force, membrane potential, and $[Ca^{2+}]_i$ during activation of rat mesenteric small arteries with norepinephrine, potassium, aluminiumfluoride, and phorbol ester. Effects of changes in pH_i . *Circ. Res.* 73:314-324, (1993a).

JENSEN, P.E., MULVANY, M.J., AALKJAER, C., NILSSON, H. y YAMAGUCHI, H. " Free cytosolic Ca^{2+} measured with Ca^{2+} -selective electrodes and Fura-2 in rat mesenteric resistance arteries". *Am. J. Physiol.* 265:H741-H746, (1993b).

JO, S.A., HIGGINS, D.M. y BERMAN, H.A. "Regulation of acetylcholinesterase in avian heart. Studies on ontogeny and the influence of vagotomy". *Circ. Res.* 70:633-643, (1992).

JOHNS, A., FREAY, A.D., ADAMS, D.J., LATEGAN, T.W., RYAN, U.S. y VAN BREMEN, C. "Role of calcium in the activation of endothelial cells". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 12(suppl. 5):S119-S123, (1988).

JOHNSON, P.S. "The myogenic response". En: BOHR, D.F., SOMNLYO, A.P. y SPARKS, H.V. (eds.) " The Cardiovascular System, handbook of Physiology, sect. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 402-442, (1980).

JOKISCH-MEHRLING, B., FEIFEL, R., ELTZE, M., RODRIGUES DE MIRANDA, J.F., LAMBRECHT, G. y MUTSCHLER, E. " M_1 -potencies of muscarinic agonists in rabbit isolated vas deferens". *Trends Pharmacol. Sci.* 10(suppl.):109, (1989).

JOST, S., DECKERS, J.W., NIKUTTA, P., RAFFLENBEUL, W., WIESE, B., HECKER, H., LIPPOLT, P., LICHTLEN, P.R., y THE INTACT INVESTIGATORS "Progression of coronary artery disease is dependent on anatomic location and diameter". *JACC* 21:1339-46, (1993).

JUNSTAD, M. y WENNMALM, A. " Release of prostaglandin from the rabbit isolated heart following vagal nerve stimulation or acetylcholine infusion". *Br. J. Pharmacol.* 52:375-379, (1974).

KAGEYAMA, M., YANAGISAWA, T., TAIRA, N. "Calcitonin gene-related peptide relaxes porcine coronary arteries via cyclic AMP-dependent mechanisms, but not activation of ATP-sensitive potassium channels". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:490-497, (1993).

KÄHLER, J., CONFORTO, A., DUDEK, R., TERMIN, A. y BING, R.J. "Synthesis of leukotrienes by freshly harvested endothelial cells". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25:647-653, (1993).

- KAI, L. ROULEAU, J.L., ANDRIES, L.J. y BRUTSAERT, D.L. "Effect of dysfunctional vascular endothelium on myocardial performance in isolated papillary muscles". *Circ. Res.* 72:768-777, (1993).
- KALSNER S. "The effects of periarterial nerve activation on coronary vessel tone in an isolated and perfused slab of beef ventricle". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57:291-297, (1979).
- KALSNER, S. "Cholinergic mechanisms in human coronary artery preparations: implications of species differences". *J. Physiol.*, 358:509-526, (1985).
- KALSNER, S. y QUILLAN, M. "Cholinergic contraction to field stimulation in coronary arteries of cattle". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249:785-789, (1989a).
- KALSNER, S. y QUILLAN, M. "Nonneurogenic relaxation to field stimulation in coronary arteries". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:461-469, (1989b).
- KALSNER, S. "Cholinergic constriction and coronary artery spasm". *Circ. Res.* 65:237-257, (1989).
- KAMM, K.E. y STULL, J.T. "The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation un smooth muscle". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:593-620, (1985)
- KAMM, K.E. y STULL, J.T. "Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers". *Ann. Rev. Physiol.* 51:299-313, (1989).
- KARNOWSKY, M.J. y ROOTS, L. "A direct-coloring thiocholine method for cholinesterase". *J. Histochem. Cytochem.* 12:219-221, (1964).
- KASA, P., MANN, S.P. y HEBB, C. "Localization of choline acetyltransferase". *Nature* 226:812-816, (1970).
- KATSUYAMA, H., ITO, S., ITOH, T. y KURIYAMA, H. "Effects of ryanodine on acetylcholine-induced Ca^{2+} mobilization in single smooth muscle cells of the porcine coronary artery". *Pflügers Arch.* 419:460-466, (1991).
- KATUSIC, Z.C., SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries". *Am. J. Physiol.* 252:H671-H673, (1987).
- KATUSIC, Z.C., SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries". *Stroke* 19:476-479, (1988).
- KAWAMURA, A., FUJIWARA, H., ONODERA, T., WU, D-J., MATSUDA, M., ISHIDA, M., TAKEMURA, G., FUJIWARA, Y. y KAWAI, C. "Response of large and small coronary arteries of pigs to intercoronary injection of acetylcholine:

angiographic and histologic analysis". *Int. J. Cardiol.* 25: 289-302, (1989).

KAWASHIMA, K., WATANABE, N., OOHATA, H., FUJIMOTO, K., SUSZUKI, Y., ISHIZAKI, Y., MORITA, I. y MUROTA, S. "Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells". *Neurosci. Lett.* 119:156-158, (1990).

KEEF, K.D. y KREULEN, D.L. "Electrical responses of guinea pig coronary artery to transmural stimulation". *Circ. Res.* 62:585-595, (1988).

KEEF, K.D. y BOWEN, S.M. "Effect of ACh on electrical and mechanical activity in guinea-pig coronary arteries". *Am. J. Physiol.* 257 (26): H1096-H1103, (1989).

KEEF, K.D., PASCO, J.S. y ECKMAN, D.M. " Purinergic relaxation and hyperpolarization in guinea pig and rabbit coronary artery: role of the endothelium". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260:592-600, (1992).

KEEF, K.D.; ECKMAN, D.M.; WIENERT, J.S. y BUXTON, I.L.O. "Role of cGMP in the initiation of relaxation with acetylcholine in guinea pig coronary artery". Glasgow, XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences, 249.67/P, (1993).

KELLEY, K.O. y FEIGL, E.O. "Segmental alpha-receptor mediated vasoconstriction in the canine coronary circulation". *Circ. Res.* 43:908-917, (1978).

KELM, M. y SCHRADER, J. "Control of coronary vascular tone by nitric oxide". *Circ. Res.* 66:1561-1575, (1990).

KENAKIN, T. "Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction". Raven Press, New York, (1987).

KITAMURA, K. y KURIYAMA, H. "Effects of acetylcholine on the smooth muscle cell of isolated main coronary artery of the guinea-pig". *J. Physiol.* 293: 119-133, (1979).

KITAZAWA, T., GAYLINN, B.D., DENNEY, G.H. y SOMLYO, A.P. " G-protein-mediated Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 266:1708-1715, (1991).

KNIGHT, D.R., SHEN, Y-T., YOUNG, M.A. y VATNER, S.F. "Acetylcholine-induced coronary vasoconstriction and vasodilation in tranquilized baboons". *Circ. Res.* 69: 706-713, (1991).

KOELLE, G.B. "Cholinesterases of the central nervous system". *J. Neuropathol.* 14:23-27, (1955).

KOMORI, K.; LORENZ, R.R. y VANHOUTTE, P.M. "Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle". *Am. J.*

Physiol. 255 (24): H207-H212, (1988).

KOMORI, K. y SUZUKI, H. "Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery". *Circ. Res.* 61: 586-593, (1987a).

KOMORI, K. y SUZUKI, H. "Heterogeneous distribution of muscarinic receptors in the rabbit saphenous artery". *Br. J. Pharmacol.* 92: 657-664, (1987b).

KONTOS, H.A. "Nitric oxide and nitrosothiols in cerebrovascular and neuronal regulation". *Stroke* 24[suppl. 1]:I-155-I-158, (1993).

KRISTEK, F. y GEROVA, M. "Autonomic nerve terminals in relation to contractile and noncontractile structures in the conduit coronary artery of the dog". *Acta Anat.* 129:149-154, (1987).

KWAN, C.Y., GARFIELD, R.E. y DANIEL, E.E. "An improved procedure for isolation of plasma membrane from rat mesenteric arteries". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11:639-659, (1979).

KWAN, C.Y., TRIGGLE, C.R., GROVER, A.K., LEE, R.M.K.W. y DANIEL, E.E. "Membrane fractionation of canine aortic smooth muscle. Subcellular distribution of calcium transport activity". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16:747-764, (1984).

KUO, L., DAVIS, M.J. y CHILIAN, W.M. "Myogenic activity in isolated subepicardial coronary arterioles". *Am. J. Physiol.* 255:H1558-H1562, (1988).

KUO, L., CHILIAN, W.M. y DAVIS, M.J. "Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium". *Circ. Res.* 66:860-866, (1990).

KUO, L., DAVIS, M.J., CANNON, S. y CHILIAN, W.M. "Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium-dependent responses by L-arginine". *Circ. Res.* 70:465-476, (1992).

KURIYAMA, H. y SUZUKI, H. "The effects of acetylcholine on the membrane and contractile properties of smooth muscle cells of the rabbit superior mesenteric artery". *Br. J. Pharmacol.* 64: 493-501, (1978).

LAMBRECHT, T.L., KENT, R.S. y WHORTON, R. "Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261:15288-15293, (1986).

LAMBRECHT, G., FEIFEL, R., FORTH, B., STOHMANN, C., TACKE, R. & MUTSCHLER, E. "p-Flouro-hexahydro-sila-difenidol: The first M₂₀-selective muscarinic antagonist". *Eur. J. Pharmacol.* 152: 193-194, (1988).

LANG, R.E., HERMANN, K., DIETZ, R., GAIDA, W., GANTEN, D., KRAFT,

K. y UNGER, T.H. "Evidence for the presence of enkephalins in the heart". *Life Sci.* 32:399-406, (1983).

LARSSON, C. y SIMONSSON, P. "Desensitization of acetylcholine induced inositol 1,4,5-triphosphate formation in neuroblastoma SH-SY5Y cells following repetitive acetylcholine stimulations". *Neurosci. Lett.* 150:141-144, (1993).

LAZARENO, S., BUCKLEY, N.J., ROBERTS, F.F. "Characterization of muscarinic M₄ binding sites in rabbit lung, chicken heart and NG 108-15 cells". *Mol. Pharmacol.* 38:805-815, (1990).

LEVER, J.D., AHMED, M. y IRVINE, G. "Neuromuscular and intracellular relationships in the coronary arterioles. A morphological and quantitative study by light and electron microscopy". *J. Anat.* 99, 829-840, (1965).

LEVY, D. y KANNEL, W.B. "Cardiovascular risks: New insights from Frammingham". *Am. Heart J.* 116:266-271, (1988).

LIN, P.J., CHANG, C-H., PEARSON, P.J., TZEN, K-Y., CHU, J-J., CHANG, J-P. y HSIEH, M-J. "Thromboxane A₂: An endothelium-derived vasoconstrictor in human internal mammary arteries". *Ann. Thorac. Surg.* 56:97-100, (1993).

LOESCH, A., DOMER, F.R., ALEXANDER, B. y BURNSTOCK, G. "Electron-immunocytochemistry of peptides in endothelial cells of rabbit cerebral vessels following perfusion with perfluorocarbon emulsion". *Brain Res.* 611:333-337, (1993).

LÖFFELHOLTZ, K. y PAPANO, A.J. "The parasympathetic neuroeffector junction of the heart". *Pharmacol. Review* 37:1-24, (1985).

LOWY, J., POULSEN, F.R., VIBERT, P.J. "Myosin filaments in vertebrate smooth muscle". *Nature* 225:1053-1054, (1970).

LÜCKHOFF, A. y BUSSE, R. "Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides ". *J. Cell. Physiol.* 126:414-420, (1986).

LUDMER, P.L., SELWYN, A.P., SHOOK, T.L., WAYNE, R.R., MUDGE, G.H., ALEXANDER, R.W. y GANZ., P. "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries". *N. Engl. J. Med.* 315:1046-1051, (1986).

LUFF, S. "Neuromuscular junctions and neuromuscular transmission in the vasculature". En: "Resistance arteries, structure and function". Ed. MULVANY, M.J., AALKJAER, C., HEAGERTY, A.M., NYBORG, N.C.B. y STRANDGAARD, S. Elsevier Science Publishers Amsterdam, (1991).

LUND, D.D., SCHMID, P.G., KELLEY, S.D., CORRY, R.J. y ROSKOSKI, R. "Choline acetyltransferase activity in rat heart after transplantation". *Am. J. Physiol.* 235:H367-H371, (1978).

LUND, D.D., SCHMID, P.G. y ROSKOSKI, R. "Choline acetyltransferase activity in rat and guinea pig heart following vagotomy". *Am. J. Physiol.* 236:H620-H623, (1979).

LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HÖKFELT, T., MARTLING, C-R., TATEMOTO, K., MUTT, V., POLAK, J., BLOOM, S.R. y GOLDSTEIN, M. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function". *Acta Physiol. Scand.* 116:477-480, (1982).

LUNDBERG, J.M. y HÖKFELT, T. "Multiple co-existence of peptides and classical transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons- functional and pharmacological implications". *Prog. Brain Res.* 68:241-262, (1986).

LÜSHER, T. "Endothelial vasoactive substances and cardiovascular disease". Raven Press, Basel, (1990).

LÜSCHER, T.F. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rats". *Hypertension* 8:334-349, (1986).

MACALPIN, R.N. "Contribution of dynamic vascular wall thickening to luminal narrowing during coronary arterial constriction". *circulation* 61:296-301, (1980).

MALDOR, R., GRIFFIN, C.J. y TAYLOR, S. "Innervation of the blood vessels in guinea pig atria". *Cardiovascl. Res.* 7, 95-104 (1978).

MALTA, E., SCHINI, V. y MILLER, R.C. "Effect of endothelium on basal and α -adrenergic stimulated calcium-fluxes in rat aorta". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 334:63-70, (1986).

MANZINI, S., PERRETTI, F., BENEDETTI, L. PRADELLES, P., MAGGI, C.A., GEPPETTI, P. " A comparison of bradykinin- and capsaicin-induced myocardial and coronary effects in isolated perfused heart of guinea-pig: involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide release". *Br. J. Pharmacol.* 97:303-312, (1989).

MARCHENKO, S.M. y SAGE, S.O. " Electical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta" *J. Physiol.* 462: 735-751, (1993).

MARCUS, A.J., WEKSLER, B.B. y JAFFE, E.A. "Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H₂ and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 253:7138-7141, (1978).

MARK, A.L., ABOUD, F.M., SCHMID, P.G., HEISTAD, D.D. y MAYER, H.F. "Differences in direct effects of adrenergic stimuli on coronary, cutaneous and muscular vessels". *J. Clin. Invest.* 51:279-287, (1972).

- MARTIN, W., VILLANI, G.M., JOTHIANANDIAN, D. y FURCHGOTT, R.F. "Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta". *J. Exp. Ther. Pharmacol.* 232: 708-716, (1985).
- MARTIN, W., DRAZAN, K.M. y NEWBY, A.C. "Methylene blue but not changes in cyclic GMP inhibits resting and bradykinin-stimulated production of prostacyclin by pig aortic endothelial cells". *Br. J. Pharmacol.* 97:51-56, (1989).
- MARTINS, J.B. y ZIPES, D.P. "Epicardial phenol interrupts refractory period responses to sympathetic but not vagal stimulation in canine left ventricular epicardium and endocardium". *Circ. Res.* 47:33-40, (1980).
- MATSUMOTO, T., KINOSHITA, M. y TODA, N. "Mechanisms of endothelium-dependent responses to vasoactive agents in isolated porcine coronary arteries". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 22:228-234, (1993).
- MCEWAN, J., LARKIN, S., DAVIES, G., CHERCHIA, S., BROWN, M., STEVENSON, J., MCINTYRE, I. y MASERI, A. "Calcitonin gene-related peptide: a potent dilator of epicardial coronary arteries". *Circulation* 74:1243-1247, (1986).
- MCGRAVEN, D.R., MARK, A.L., ABOUD, F.M. y MAYER, H.E. "Responses of coronary vessels to adrenergic stimuli". *J. Clin. Invest.* 50:773-778, (1971).
- MCPHERSON, G.A. y ANGUS, J.A. "Evidence that acetylcholine mediated hyperpolarization of the rat small mesenteric artery does not involve the K⁺ channel opened by cromakalim". *Br. J. Pharmacol.* 103: 1184-1190, (1991).
- MEISHERI, K.D. y VAN BREMEN, C. "Effect of beta-adrenergic stimulation on calcium movements in rabbit aortic smooth muscle. Relationship with cyclic AMP". *J. Physiol.* 331:429-441, (1982).
- MERKE, G. DAUT, J. "Electrical response of cultured guinea-pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators". *J. Physiol.* 430: 251-272, (1990).
- MENNINGER, G.A. y DAVIS, M.J. "Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response". *Am. J. Physiol.* 263:H647-H659, (1992).
- MIAO, F.J-P. y LEE, T. J-F. "VIP-ergic and cholinergic innervations in internal carotid arteries of the cat and rat". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 18:369-378, (1991).
- MILLNER, P., RALEVIC, V., HOPWOOD, A.M., FEHER, E., LINCOLN, J., KIRKPATRICK, K.A. y BURNSTOCK, G. "Ultrastructural localization of substance P and choline acetyltransferase in endothelial cells exposed to increased flow". *Experientia* 45:121-125, (1989).
- MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., DROOGMANS, G., DECLERCK, I., PLESER,

L. y CASTEELS, R. "Uptake characteristics of the InsP_3 -sensitive and -insensitive Ca^{2+} pools in porcine aortic smooth-muscle cells: different Ca^{2+} -uptake mechanism". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174:1183-1188, (1991).

MIWA, K. y TODA, N. "Regional differences in the response to vasoconstrictor agents of dog and monkey isolated coronary arteries". *Br. J. Pharmacol.* 82:295-301, (1984).

MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S. y VANE, J.R. "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation". *Nature* 263:633-665, (1976).

MONCADA, S., PALMER, R.M.J. y HIGGS, E.A. "The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator". *Hypertension* 12:365-372, (1988).

MOORE, P.K., AL-SWAYEH, O.A., CHONG, N.W.S., EVANS, R.A. y GIBSON, A. " L-N^G -nitro-arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 99:408-412, (1990).

MORELAND, R.S. y BOHR, D.G. "Adrenergic control of coronary arteries". *Fed. Proc.* 43:2857-2561, (1984).

MORGAN, J.P. y MORGAN, K.G. "Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein". *J. Physiol.* 351:155-167, (1984).

MORRIS, R., SOUTHAM, E., BRAID, D.J. y GARTHWAITE, J. "Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurons and their satellite cells". *Neurosci. Lett.* 137:29-32, (1992).

MORRISON, K.J. y VANHOUTTE, P.M. "Characterization of muscarinic receptors that mediate contraction of guinea-pig isolated trachea to choline esters: effect of removing epithelium". *Br. J. Pharmacol.* 106:672-676, (1992).

MUELLER, E. y VAN BREMEN, C. "Role of intracellular Ca^{2+} sequestration in β -adrenergic relaxation of a smooth muscle". *Nature* 281:682-683, (1979).

MULDERRY, P.K., GHATEI, M.A., RODRIGO, J., ALLEN, A.M., ROSENFELD, J.M., POLAK, J.M. y BLOOM, S.R. "Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat". *Neurosci.* 14:947-954, (1985).

MÜLSCH, A., BASSENGE, E. y BÜSSE, R. "Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: Evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism". *Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* 340:767-770, (1989).

MULVANY, M.J. y HALPERN, W. "Mechanical properties of vascular smooth muscle in situ" *Nature* 260:617-619 (1976).

MULVANY, M.J. y HALPERN W. "Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats". *Circ. Res.* 41: 19-26, (1977).

MULVANY, M.J. y WARSHAW, D. "The active tension-length curve of vascular smooth muscle related to its cellular components". *J. Gen. Physiol.* 74:85-104, (1979).

MULVANY, M.J. y NYBORG, N.C.B. "An increased calcium sensitivity of mesenteric vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats". *Br. J. Pharmacol.* 71:585-596, (1980).

MYERS, P.R., BANITT, P.F., GUERRA, R. y HARRISON, D.G. "Characteristics of canine coronary resistance arteries. importance of endothelium". *Am. J. Physiol.* 257:H603-H610, (1989).

MYERS, P.R., MINOR, R.L., GUERRA, R., BATES, J.N. y HARRISON, D.G. " Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocystein than nitric oxide. *Nature* 345:161-163, (1990).

MYERS, P.R., BANITT, P.F., GUERRA, R. y HARRISON, D.G. "Role of the endothelium in modulation of the acetylcholine vasoconstrictor response in porcine coronary microvessels". *Cardiovascl. Res.* 25:129-137, (1991).

NABEL, E.G., SELWYN, A.P. y GANZ, P. "Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: An endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis". *J. Am. Coll. Cardiol.* 16:349-356, (1990).

NAGAO, T. y VANHOUTTE, P.M. " Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery". *J. Physiol.* 445: 355-367, (1992).

NAGAO, T., ILLIANO, S. y VANHOUTTE, P.M. "Calmodulin antagonists inhibit endothelium-dependent hyperpolarization in the canine coronary artery". *Br. J. Pharmacol.* 107: 382-386, (1992).

NAKAYAMA, K., OSOL, G. y HALPERN, W. "Reactivity of isolated porcine coronary arteries to cholinergic and adrenergic drugs and transmural pressure changes". *Circ. Res.* 62: 741-748, (1988).

NATHANSON, N.M. "Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor" *Annu. Rev. Neurosci.* 10:195-236, (1987).

NAVARATNAM, V. y PALKAMA, A. "Cholinesterases in the walls of the great arterial trunks and coronary arteries. *Acta Anat.* 60: 445-448, (1965).

NAVARATNAM, V., LEWIS, P.R. y SHUTE, C.C.D. "Effects of vagotomy on the cholinesterase content of the preganglionic innervation of the rat heart". *J. Anat.*

103:225-232, (1968).

NEDERGAARD, O.A. "Effect of nicotine on neuroeffector transmission in blood vessels". En: "The pharmacology of nicotine" Ed. RAND, M. y THURAU, K. IRL Press, Oxford, Washington DC, (1988).

NEILD, T.O., SHEN, K.Z. y SUPRENANT, A. "Vasodilatation of arterioles by acetylcholine released from single neurones in the guinea-pig submucosal plexus." *J. Physiol.* 420:247-265, (1990).

NELSON, M.T., MCCARRON, J.G. y QUAYLE, J.M. "Ion channels in resistance arteries". En: *The resistance vasculature*. Ed. Bevan, J.A., Halpern, W. y Mulvany, M.J. Humana Press, New Jersey, p. 265-279, (1991).

NILSSON, H. y SJÖBLOM, N. "Distension-dependent changes in noradrenaline sensitivity in small arteries from the rat". *Acta Physiol. Scand.* 125:429-435, (1985).

NIMMO, H.G. y COHEN, P. "Hormonal control of protein phosphorylation". *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 8:145-266, (1977).

NISHIKAWA, M., DELANEROLLE, P., LINCOLN, T.H.M. y ADELSTEIN, R.S. "Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase". *J. Biol. Chem.* 259:8429-8436, (1984).

NISHIMURA, J. y VAN BREMEN, C. "Energetic aspects of the regulation of Ca^{2+} sensitivity of permeabilized rabbit mesenteric artery. Possible involvement of second Ca^{2+} regulatory system in smooth muscle contraction". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:397-402, (1991).

NITENBERG, A., VALENSI, P., SACHS, R., DALI, M., APTECAR, E. y ATTALI, J-R. "Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilatation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function". *Diabetes* 42:1017-1025, (1993).

NOKASA, S., YAMAMOTO, T. y YASUNAGA, K. "Localization of vagal cardio-inhibitory preganglionic neurons within rat brain stem". *J. Comp. Neurol.* 186:79-92, (1979).

NOLAN, K.D., KEAGY, B.A., RAMADAN, F.M., JOHNSON, G. y HENKE, D.C. "Endothelial cells can synthesize leukotriene B_4 ". *J. Vascl. Surg.* 12:298-304, (1990).

NOREL, X., ANGRISANI, M., LABAT, C., GORENNE, I., DULMET, E., ROSSI y BRINK, C. "Degradation of acetylcholine in human airways. role of butyrylcholinesterase". *Br. J. Pharmacol.* 108:914-919, (1993).

NYBORG, N.C.B. y MIKKELSEN, E.O. "In vitro studies on responses to noradrenaline, serotonin, and potassium of intramyocardial and mesenteric

- resistance vessels from Wistar Rats". *J. Cardiovascl. Res.* 7:417-423, (1985).
- NYBORG, N.C.B. y MIKKELSEN, E.O. "Comparison of the inhibitory effects of nifedipine and nimodipine on mechanical responses of isolated rat coronary small arteries". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9:519-524, (1987).
- NYBORG, N.C.B., BAANDRUP, U., MIKKELSEN, E.O. y MULVANY, M.J. "Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries". *Phlügers Arch.* 410:664-670, (1987).
- NYBORG, N.C.B. "Action of noradrenaline on isolated rat proximal and distal coronary arteries: Selective release of endothelium-derived relaxing factor in proximal arteries". *Br. J. Pharmacol.*, 100: 552-556, (1990).
- NYBORG, N.C.B., PRIETO, D., MIKKELSEN, E.O., SIMONSEN, U. y BENEDITO, S. "Heterogeneous pharmacodynamic reactivity in rat coronary arteries". In *Resistance arteries, structure and function*. Ed. M.J Mulvany, Aalkjær, C., Heagerty, A.M., Nyborg, N.C.B. & Strandgaard, S. pp. 280-284. Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1991).
- OBRIEN, R.F., ROBBINS, R.J. y MCMURTRY, I.F. "Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance". *J. Cell. Physiol.* 132:263-270, (1987).
- OKAMURA, T., MINAMI, Y. y TODA, N. "Endothelium-dependent and -independent mechanisms of action of acetylcholine in monkey and dog isolated arteries". *Pharmacology* 38:279-288, (1989).
- OSOL, G., LAHER, I. y KELLEY, M. "Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries". *Am. J. Physiol.* 265:H415-H420, (1993).
- OZAKI, H. y URAKAWA, N. "Effects of K-free solution on tension development and Na content in vascular smooth muscles isolated from guinea-pig, rat and rabbit". *Pflügers Arch.* 389:189-193, (1981).
- PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G. y MONCADA, S. " Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor". *Nature* 327: 524-526, (1987).
- PARDINI, B.J., PATEL, K.P., SCHMID, P.G. y LUND, D.D. "Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat". *J. Auton. Nerv. Syst.* 20:91-101, (1987).
- PAREKH, A.B. y BRADING, A.F. "The M₃ muscarinic receptor links to three different transduction mechanisms with different efficacies in circular muscle of guinea-pig stomach". *Br. J. Pharmacol.* 106:639-643, (1992).
- PARENT, R., AL-OBAIDI, M. y LAVALLEE, M. "Nitric oxide formation

contributes to beta-adrenergic dilatation of resistance coronary vessels in conscious dogs". *Circ. Res.* 73:241-251, (1993).

PARK, K.H., RUBIN, L.E., GROSS, S.S. y LEVI, R. "Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites". *Circ. Res.* 71:992-1001, (1992).

PARNAVELAS, J.G., KELLEY, W. y BURNSTOCK, G. "Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain". *Nature* 316:724-725, (1985).

PELC, L.R., GROSS, G.J. y WARLTIER, D.C. "Changes in regional myocardial perfusion by muscarinic receptor subtypes in dogs". *Cardiovascl. Res.* 20:482-489, (1986).

PELC, L.R., DAEMMGEN, J.W., GROSS, G.J. y WARLTIER, D.G. "Muscarinic receptor subtypes mediating myocardial blood flow redistribution". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 11:424-431, (1988).

PERALTA, E.G., ASHKENAZI, A., WINSLOW, J.W., RAMACHANDRAN, J. Y CAPON, D.I. "Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes". *Nature* 334:434-437, (1987).

PFÄFFINGER, P.J., MARTIN, J.M., HUNTER, D., D., NATHANSON, N.M. y HILLE, B. "GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel". *Nature* 317:536-538, (1985).

PILLAY, C.V. y REID, J.V.O. "Histochemical localization of acetylcholinesterase in the wall of cardiac blood vessels in the baboon, dog and velvet monkey". *Basic Res. Cardiol.* 77:213-219, (1982).

POOLE, J.C.F., SANDERS, A.G. y FLOREY, H.W. "The regeneration of aortic endothelium". *J. Path. Bact.* 75:133-143, (1958).

POPSCU, L.M., PANOIU, C., HINESCU, M.E. y NUTU, O. "The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle cells". *Eur. J. Pharmacol.* 107:393-394, (1985).

PRIETO, D., BENEDITO, S., SIMONSEN, U. y NYBORG, N.C.B. "Regional heterogeneity in the contractile and potentiating effects of neuropeptide Y in rat isolated coronary arteries: modulatory action of the endothelium". *Br. J. Pharmacol.* 102: 754-758, (1991a).

PRIETO, D., BENEDITO, S. y NYBORG, N.C.B. "Heterogeneous involvement of endothelium in calcitonin gene-related peptide-induced relaxation in coronary arteries from rat". *Br. J. Pharmacol.* 103:1764-1768, (1991b).

PRIETO, D.P.O., MULVANY, M.J. y NYBORG, N.C.B. "Effects of (+)-S-12967

and (-)-S-12968, two enantiomers of a new slow-acting 1,4-dihydropyridine, on rat coronary resistance arteries". *Eur. J. Pharmacol.* 238:27-35, (1993).

PRIETO, D.P.O., SIMONSEN, U., MARTIN, J., HERNANDEZ, M., RIVERA, L., LEMA, L., GARCIA, P. y GARCIA-SACRISTAN, A. "Histochemical and functional evidence for a cholinergic innervation of the equine ureter". *J. Auton. Nerv. Syst.* 47:159-170, (1994).

QUILLEN, J., SELLKE, F., BARNITT, P. y HARRISON, D.G. "The effect of norepinephrine on the coronary microcirculation". *J. Vasc. Res.* 29:2-7; (1992).

RAND, V.E. y GARLAND, C.J. "Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the rabbit basilar artery: importance of membrane hyperpolarization". *Br. J. Pharmacol.* 106:143-150, (1992).

RAPOPORT, R.M. y MURAD, F. "Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP". *Circ. Res.* 52:352-357, (1983).

RAYMAKERS, L. AGOSTINI, B. y HASSALBACH, W. "Electron cytochemistry of oxalate-stimulated calcium uptake in microsomes from the smooth muscle of the pig stomach". 65:121-129, (1980).

REES, D.D., PALMER, R.M.J., HODSON, H.F. y MONCADA, S. " A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation". *Br. J. Pharmacol.* 96:418-424, (1989a).

REES, D.D, PALMER, R.M.J. y MONCADA, S. " Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3375-3378, (1989b)

REID, J.V.O., ITO, B.R., HUANG, A.H., BUFFINGTON, C.W. y FEIGL, E.O. "Parasympathetic control of transmural coronary blood flow in dogs". *Am. J. Physiol.* 249:H337-H343, (1985).

RICHARD, V., TANNER, F.C., TSCHUDI, M. y LÜSCHER, T. "Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries". *Am. J. Physiol.* 259: H1433-H1439, (1990).

RICKENBACKER, J. y MÜLLER, E. "The development of cholinergic ganglia in the chick embryo heart". *Anat. Embryol.* 155:253-258, (1979).

RIKER, W.F. y WESCOE, W.C. "The pharmacology of flaxodil with observations on certain analogues". *Ann. NY Acad. Sci.* 54:373-392, (1951).

RINNER, I., DOODS, H.N., VAN CHARLDORP, K.J., DAVIDESKO, D. y VAN ZWIETEN, P.A. "Binding of muscarinic receptor antagonists to pig coronary smooth muscle". *Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* 337:146-150, (1988).

ROOKE, T., COHEN, R.A., VERBEUREN, T.J. y VANHOUTTE, P.M. "Non-neurogenic inhibitory effect of electrical impulses in isolated canine coronary arteries". *Eur. J. Pharmacol.* 80:251-254, (1982).

RORIE, D.K., y SHEPHERD, J.T. "Norepinephrine content, release and disposition in isolated dog coronary artery". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165:384-390, (1980).

ROSKOSI, R., MCDONALD, R.J., ROSKOSI, L.M., MARVIN, N.N. y HERMSMEYER, K. "Choline acetyltransferase activity in heart: evidence for neuronal and not myocardial origin". *Am. J. Physiol.* 233:H642-H646, (1977).

ROSOLOWSKY, M., FALCK, J.R., WILLERSON, J.T. y CAMPPELL, W.B. "Synthesis of lipoxygenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries". *Circ. Res.* 66:608-621, (1990).

ROSZKOWSKI, A.P. "An unusual type of ganglionic stimulant". *Br. J. Pharmacol.* 132:156-170, (1961).

ROWELL, P.P. y SASTRY, B.V.R. "Human placental cholinergic system: depression of the uptake of α -aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216:232-238, (1981).

RUBANYI, G. y VANHOUTTE, P.M. "Endothelium-removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by beta-adrenergic agonists and adenosine". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 7:139-144, (1985).

RUBANYI, R.M. y PAUL, R.J. "Two distinct effects of oxygen on vascular tone in isolated porcine coronary arteries". *Circ. Res.* 56:1-10, (1985).

RUBANYI, G.M. y VANHOUTTE, P.M. "Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor" *Am. J. Physiol.* 250:H822-H827, (1986).

RUDEHILL, A., SOLLEVI, A., FRANCO-CERECEDA, A. y LUNDBERG, J.M. "Neuropeptide Y (NPY) and the pig heart: Release and coronary vasoconstrictor effects". *Peptides* 7:821-826, (1986).

RÜEGG, J.C. "Calcium in muscle contraction". 2nd. Ed. Springer-Verlag, London, pp.1-337, (1992).

SAITO, a., WU, J.Y., LEE, T.J.F. "Evidence for the presence of cholinergic nerves in cerebral arteries: an immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase". *J. Cereb. Blood Flow Metab* 5:327-334, (1985).

SAKANASHI, M., ARAKI, H. y YONEMURA, K. "Indomethacin-induced contractions of dog coronary arteries". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 2:657-665, (1980).

SCHEID, C.R., HONEYMAN, T.W. y FAY, F.S. "Mechanism of β -adrenergic relaxation of smooth muscle". *Nature* 277:32-36, (1979).

SCHENK, E.A. y BADAWI, A.E. "Dual innervation of arteries and arterioles. A histochemical study". *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 91:170-179, (1968).

SCHIEBLER, T.H. y WINCKLER, J. "On the vegetative cardiac innervation". *Prog. Brain Res.* 34:405-413, (1971).

SCHINI, V.B., JUNQUERO, D.C., SCOTT-BURDEN, T. y VANHOUTTE, P.M. "Interleukin- 1β induces the production of an L-arginine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:114-121, (1991).

SCHWARTZMAN, M., CARROLL, M.A., IBRAHAM, N.G., FERRERI, N.R., SONGUMIZE, E. y MCGIFF, J.C. "Renal arachidonic metabolism". *Hypertension* 7(suppl. 1):I-136-I-144, (1985).

SELLKE, F.W., AMSTRONG, M.L. y HARRISON, D.G. "Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates". *Circulation* 81:1586-1593, (1990).

SHEPHERD, J.T. y VANHOUTTE, P.M. "Neurohumoral regulation". En: "The human cardiovascular system. Facts and concepts". Raven Press, New York, (1980).

SHIMOKAWA, H., FLAVAHAN, N.A., LORENZ, R.R. y VANHOUTTE, P.M. "Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig". *Br. J. Pharmacol.* 95:1197-1203, (1988).

SHOJI, T., ISHIHARA, H., ISHIKAWA, T., SAITO, A. y GOTO, K. "Vasodilating effects of human and rat calcitonin gene-related peptides in isolated porcine coronary arteries". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 336:438-444, (1987).

SHRÖR, K. "Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells". *Basic Res. Cardiol.* 80:502-514, (1985).

SCHRÖR, K. y VERHEGGEN, R. "Use of human post-mortem cerebral blood vessels to study vasospasm". *TIPS* 9:71-74, (1988).

SILVER, P.J., SCHMIDT-SILVER, C. y DISALVO, J. " β -adrenergic relaxation and cAMP kinase activation in coronary arterial smooth muscle". *Am. J. Physiol.* 242:H177-H184, (1982).

SIMONSEN, U., EHRNROOTH, E., GERDES, L.U., FAERGEMAN, O., BUCH, J., ANDREASEN, F. y MULVANY, M.J. "Functional properties in vitro of systemic small arteries from rabbits fed a cholesterol-rich diet for 12 weeks". *Clin. Sci.* 80:119-129, (1991).

SIMONSEN, U., PRIETO, D., MULVANY, M.J., EHRENROOTH, E., KORSGAARD, N. y NYBORG, N.C.B. "Effect of induced hypercholesterolemia in rabbits on functional responses of isolated large proximal and small distal coronary arteries". *Arterioscl. Thromb.* 12: 380-392, (1992).

SNEDDON, P. y GRAHAM, A. "Role of nitric oxide in the autonomic innervation of smooth muscle". *J. Autonom. Pharmacol.* 12:445-456, (1992).

SPERELAKIS, N. "Electrophysiology of vascular smooth muscle of the coronary artery" En: KALSNER, S. (Ed.), "The coronary artery". Croom Helm, London and Canberra, pp. 118-167, (1982).

STEINSLAND, O.S. y FURCHGOTT, R.F. "Desensitization of the adrenergic neurons of the isolated rabbit ear artery to nicotinic agonists". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193:138-148, (1975).

STRANDEN, N.B.; QUALE, J.M.; DAVIS, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y. y NELSON, T.M. "Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle". *Science*, 245: 177-180, (1989).

SU, C. y BEVAN, J.A. "The electrical response of pulmonary artery muscle to acetylcholine, histamine and serotonin". *Life Sci.* 4: 1025-1029, (1965)

SUN, D., MESSINA, E.J. KALEY, G. y KOLLER, A. "Characteristics and origin of myogenic response in isolated mesenteric arterioles". *Am. J. Physiol.* 263:H1486-H1491, (1992).

SUTHERLAND, C. y WALSH, M.P. "Phosphorylation of caldesmon prevents its interaction with smooth muscle myosin". *J. Biol. Chem.* 264:578-583, (1989).

SWÄRD, K., JOSEFSSON, M., LYDRUP, M-L. y HELLSTRAND, P. "Effects of metabolic inhibition on cytoplasmic calcium and contraction in smooth muscle of rat portal vein". *Acta Physiol. Scand.* 148:265-272, (1993).

TAKAHASHI, M., OZAKI, N. y KAWAKITA, S. "Vascular effects of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid on canine arteries". *Jpn. J. Pharmacol.* 37:325-334, (1985).

TAKAHASHI, M., SOHNA, H. y MORITA, F. "The steady state intermediate of scallop smooth muscle myosin ATPase and effect of light chain phosphorylation. A molecular mechanism for catch contraction". *J. Biochem* 104:102-107, (1988).

TALLARIDA, R.J. & MURAY, R.B. "Manual of pharmacologic calculations with computer program". Springer-Verlag, New York, (1984).

TANAKA, K., HASSALL, C.J.S. y BURNSTOCK, G. "Distribution of intracardiac neurones and nerve terminals that contain a marker for nitric oxide, NADPH-diaphorase, in the guinea-pig heart". *Cell. Tissue Res.* 273:293-300, (1993a).

TANAKA, K., OHSHIMA, H., ESUMI, H. y CHIBA, T. "Direct synaptic contacts of nitric oxide synthase-immunoreactive nerve terminals on the neurons of the intracardiac ganglia of the guinea-pig". *Neuroscience Lett.* 158:67-70, (1993b).

TANZ R.D. y NAYLER, W.G. "Concentration-dependent desensitization of isolated porcine coronary arterial segments to acetylcholine". *Arch. Int. Pharmacodyn.* 312:110-125, (1991).

TARE, M.; PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H.A.; NEILD, T.O. y DUSTING, G.J. "Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium". *Nature* 346: 69-71, (1990).

TATESON, J.E., MONCADA, S. y VANE, J.R. "Effect of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets". *Prostaglandins* 13:389-397, (1977).

THOM, S.M.J., HUGHES, A.D., GOLDBERG, P., MARTIN, G., SCHACHTER, M. y SEVER, P.S. "The actions of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide as vasodilators in man in vivo and in vitro". *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24:129-134, (1987).

TIAN, R., AALKJAER, C., LASSEN, N.A., MULVANY, M.J. y ANDREÅSEN, F. "Role of pH and nitric oxide in the CO₂-induced cerebral vasodilatation". XXXII Congress of the international union of physiological sciences". Glasgow 249.42/P, (1993).

TODA, N. "Regional differences in the response to nicotine in isolated canine arteries". *Eur. J. Pharmacol.* 35:151-160, (1976).

TODA, N., HAYASHI, S. y HATTORI, K. "Analysis of the effects of tyramine and norepinephrine in isolated canine cerebral and mesenteric arteries". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205:382-388, (1978).

TODA, N. y HAYASHI, S. "Responses of canine coronary arteries to transmural electrical stimulation and nicotine". *Eur. J. Pharmacol.* 80:73-81, (1982).

TODA, N. y MIYAZAKI, M. "Senescent beagle coronary arteries in response to catecholamines and adrenergic nerve stimulation". *J. Gerontology* 42:210-218, (1987).

TODA, N., BAIN, K., AIKABA, T. "Heterogeneity in mechanism of bradykinin action in canine isolated blood vessels". *Eur. J. Pharmacol.* 135:321-329, (1987).

TODA, N., OKAMURA, T. "Endothelium-dependent and -independent responses to vasoactive substances of isolated human coronary arteries". *Am. J. Physiol.* 257:H988-H995, (1989).

TODA, N. y OKAMURA, T. "Responses to perivascular nerve stimulation of distal temporal arteries from dogs and monkeys". *J. Cardiovascl. Pharmacol.* 22:744-749,

(1993).

TOMOIKE, H. EGASHIRA, K., YAMADA, A., HAYASHI, Y. y NAKAMURA, M. "Leukotriene C₄- and D₄-induced diffuse peripheral constriction of swine coronary artery accompanied by ST elevation on the electrocardiogram: Angiographic analysis". *Circulation* 76:480-487, (1987).

TRACEY, W.R. y PEACH, M.J. "Differential muscarinic receptor mRNA expression by freshly isolated and cultured bovine aortic endothelial cells". *Circ. Res.* 70:234-240, (1992).

TRACHTE, G.L., LEFER, A.M., AHARONY y COL. "Potent constriction of cat coronary arteries by hydroperoxides of arachidonic acid and its blockade by anti-inflammatory agents". *Prostaglandins* 18:909-914, (1979).

TREASURE, C.B., VITA, J.A., COX., D.A., FISH, D., GORDON, J.B., MUDGE, G.H., COLUCCI, W.S., SUTTON, M.G.J., SELWYN, A.P., ALEXANDER, R.W. y GANZ, P. "Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy". *Circulation* 81:772-779, (1990).

TREASURE, C.B., MANOUKIAN, S.V., KLEIN, J.L., VITA, J.A., NABEL, E.G., RENWICK, G.H., SELWYN, A.P., ALEXANDER, R.W. y GANZ, P. "Epicardial coronary artery response to acetylcholine are impaired in hypertensive patients". *Circ. Res.* 71:776-781, (1992).

TRIGUERO, D., LOPEZ DE PABLO, A.L., GOMEZ, B. y ESTRADA, C. "Cholinergic system in intracerebral microvasculature. functional aspects in the unanesthetized goat". En: "Stroke and microcirculation". J. CERVOS-NAVARRO y FERSZT, R. Raven Press, New York, pp. 193-197, (1987).

TSCHUDI, M., RICHARD, V., BÜHLER, F.R. y LÜSCHER, T. "Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries ". *Am. J. Physiol.* 260: H13-H20, (1991).

TUCEK, S. "Problems in the organisation and control of acetylcholine synthesis in brain neurons". *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 44:1-46, (1984).

TWART, C.H.C. y VAN BREMEN, C. " Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sacroplasmatic reticulum in vascular smooth muscle". *Circ. Res.* 62:961-964, (1988).

UNVERFERTH, D.V., O'DORISIO, T.M., MUIR, W.W., WHITE, J., MILLER, M.M., HAMLIN, R.L. y MAGORIEN, R.D. "Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the canine cardiovascular system". *J. Lab. Clin. Med.* 106:542-550, (1985).

URBAN, L. y PAPKA, R.E. "Origin of small primary afferent substance P-immunoreactive nerve fibers in the guinea pig heart". *J. Auton. Nerv. Syst.* 12:321-

331, (1985).

URSELL, P.C. y MAYES, M. "The majority of nitric synthase in pig heart is vascular and not neural". *Cardiovascl. Res.* 27:1920-1924, (1993).

WALLENSTEIN, S., ZUCKER, G.L. & FLEISS, J.L. "Some statistical methods useful in circulation research". *Circ. Res.*, 47:1-9, (1980).

WATSON, M., VICKROY, T.W., ROESKE, W.R. y YAMAMURA, H.I. "Functional and biochemical basis for multiple muscarinic acetylcholine receptors". *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 9:569-574, (1985).

WEIHE, E., REINECKE, M. y FORSMANN, W.G. "Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart". *Cell. Tiss. Res.* 236:527-540, (1984).

WHARTON, J., GULBENKIAN, S., MULDERY, P.K., GHATEI, M.A., MACGREGOR, G.P., BLOOM, S.R. y POLAK, J.M. "Capsaicin induces a depletion of calcitonin gene related peptide (CGRP)-immunoreactive nerves in the cardiovascular system of the guinea-pig and rat". *J. Auton. Nerv. Syst.* 16:289-309, (1986).

WHARTON, J. y GULBENKIAN, S. "Peptides in the mammalian cardiovascular system". En: "Regulatory Peptides". Ed. J.M. POLAK, Birkhäuser Verlag, Basel, (1989).

WILLIAMS, D.A., HEAD, S.I., BAKKER, A.J. y STEPHENSON, D.G. "Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* 318:558-561, (1985).

WINQUIST, R.J., FAISON, E.P., WALDMAN, S.A., SCHWARTZ, K., MURAD, F., MURAD, F. y RAPOPROT, T.M. "Atrial natriuretic factor elicits and endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7661-7664, (1984).

WHITTAKER, V.P. "The storage and release of acetylcholine". *Trends Pharmacol. Sci.* 6:312-315, (1986).

WOODMAN, O.L. "Coronary vascular responses to nicotine in the anaesthetized dog". *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 343:65-69, (1991).

WOODRUFF, G.N. y WALKER, R.J. "A specific inhibitory action of McN-A343 on acetylcholine-sensitive neurones in the brain of the snail". *Eur. J. Pharmacol.* 14:81-85, (1971).

WOOLARD, H.H. "The innervation of the heart". *J. Anat.* 60:345-373, (1926).

WUYTACK, F. y CASTEELS, R. "Demonstration of a (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase

activity probably related to Ca^{2+} -transport in the microsomal fraction of porcine coronary artery smooth muscle". *Biochem. Biophys. Acta* 595:257-263, (1980).

WUYTACK, F., RAEYMAKERS, L., VERBIST, J., DESMEDT, H. y CASTEELS, R. "Evidence for the presence in smooth muscle of two types of Ca^{2+} -transport ATPase". *Biochem. J.* 224:445-451, (1984).

VAN BREMEN, C., HWANG, K., LOUTZENHISER, R., LUKEMAN, S. y YAMAMOTO, H. "Calcium entry into vascular smooth muscle". En: *Cardiovascular effects of dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 48-71, (1985).

VAN CHARLDORP, K.J., DE JONGE, A., DAVIDESKO, D., RINNER, I., DOODS, H.N. y VAN ZWIETEN, P.A. "Coronary constriction induced by vagal stimulation in the isolated rat heart". *Eur. J. Pharmacol.* 136:135-136, (1987).

VAN CHARLDORP, K.J. y VAN ZWIETEN, P.A. "Comparison of the muscarinic receptors in the coronary artery, cerebral artery and atrium of the pig". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 339: 403-408, (1989).

VAN WINKLE, D.M. y FEIGL, E.O. "Acetylcholine causes coronary vasodilation in dogs and baboons". *Circ. Res.* 65: 1580-1593, (1989).

VATNER, S.F., PAGANI, M., MANDERS, W.T. y PASIPOULARIDES, A.D. "Alpha adrenergic vasoconstriction and nitroglycerine vasodilatation of large coronary arteries in the conscious dog". *J. Clin. Invest.* 65:5-14, (1980).

VENTURINI, C.M., PALMER, R.M.J. y MONCADA, S. "Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266:1497-1500, (1993).

VINCENT, S.R. y KIMURA, H. "Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain". *Neurosci.* 46:755-784, (1992).

VON EULER, U.S. "A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relation to adrenaline and nor-adrenaline". *Acta Physiol. Scand.* 12:73-97, (1946).

YAMADA, S., YAMAZAWA, T., HARADA, Y., YAMAMURA, H.I. y NAKAYAMA, K. "Muscarinic receptor subtype in porcine coronary artery". *Eur. J. Pharmacol.* 150:373-376, (1988).

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YASAKI, T., GOTO, U. y MASAKI, T. "A novel vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells". *Nature* 332:411-415, (1988).

YASUE, H., HORIO, Y., NAKAMURA, N., FUJI, H., IMOTO, N., SONODA, R., KUGIYAMA, K., OBATA, K., MORIKAMI, Y. y KIMURA, T. "Induction of

coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system in the pathogenesis of coronary artery spasm". *Circulation* 74:955-963, (1986).

YOUNG, M.A. y VATNER, S.F. "Regulation of large coronary arteries". *Circ. Res.* 59:579-596, (1986).

YOUNG, M.A., KNIGHT, D.R. y VATNER, S.F. "Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels". *Prog. Cardiovascl. Dis.* XXX(3):211-234, (1987).

YOUNG, M.A., KNIGHT, D.R. y VATNER, S.F. "Parasympathetic coronary vasoconstriction induced by nicotine in conscious calves". *Circ. Res.* 62:891-895, (1988).

ZHANG, L. y BUXTON, I.L.O. "Protein kinase regulation of muscarinic receptor signalling in colonic smooth muscle". *Br. J. Pharmacol.* 108:613-621, (1993).

ZEIHER, A.M., DEXLER, H., WOLLSCHLÄGER, H. y JUST, H. "Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis". *Circulation* 84:1984-1992, (1991).

ZUBERBUHLER, R.C. y BOHR, D.F. "Responses of coronary smooth muscle to catecholamines. *Circ. Res.*" 16:431-440, (1965).