

Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

Artículo Original \_\_\_\_\_

**Respuesta de las arterias pulmonares de lechón al óxido nítrico y a dadores de óxido nítrico: Evolución con la edad postnatal y modulación por el estrés oxidativo\***

FRANCISCO PÉREZ-VIZCAÍNO, ÁNGEL L COGOLLUDO, JOSÉ GUSTAVO LÓPEZ-LÓPEZ, FRANCISCO ZARAGOZÁ-ARNÁEZ, MANUEL IBARRA.

*Departamento de Farmacología. Instituto de Farmacología y Toxicología (CSIC-UCM). Facultad de Medicina. Universidad Complutense*

**RESUMEN**

En el presente estudio hemos analizado la influencia de la edad postnatal y los cambios en el nivel de estrés oxidativo sobre la vasodilatación pulmonar *in vitro* inducida por el NO endógeno, el NO exógeno y donadores de NO. Se han utilizado las arterias pulmonares procedentes de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad para el registro de la fuerza contráctil. En las arterias pulmonares de lechones de 1 y 15 días de edad, el estrés oxidativo basal

---

\* Premio Cepa Schwarz Pharma, S.L de la Real Academia de Farmacia. Año 2001

modula la acción vasodilatadora del NO, siendo la NAD(P)H oxidasa de la adventicia la principal fuente endógena del anión superóxido. La vasodilatación inducida por el NO de origen endotelial y por el NO exógeno aumenta con la edad, posiblemente por un incremento en la actividad de la ciclooxigenasa-1 en los primeros momentos de vida extrauterina que modularía el efecto vasodilatador del NO. Finalmente, encontramos que el NO y los donadores de NO, SNAP y nitroprusiato (SNP), difieren en la cinética y distribución regional de la liberación del NO, lo que influye en la susceptibilidad para la inactivación por el anión superóxido y por la oxihemoglobina.

**Palabras clave:** Óxido nítrico, neonato, arterias pulmonares, superóxido.

#### SUMMARY

##### **Nitric oxide- and nitric oxide donor-induced responses in piglet pulmonary arteries: Postnatal maturation and modulation by oxidative stress**

We have analyzed the influence of postnatal age and oxidative stress on the *in vitro* pulmonary vasodilator activity of nitric oxide and nitric oxide donors. Isolated pulmonary arteries from 1 d and 2 week old piglets were mounted for isometric force recording. Basal oxidative stress modulated the vasodilator activity of nitric oxide, being the adventitial NADPH oxidase the main endogenous source of superoxide anion. Endogenous and exogenous NO-induced vasodilatation increased with age, possibly through an increased cyclooxygenase-1 activity during the first hours of extrauterine life which could inactivate NO. Finally, we found that NO and the NO donors SNP and SNAP not only showed different kinetics and regional distribution of NO release but also a different susceptibility to be inactivated by superoxide and oxyhemoglobin.

**Keywords:** Nitric oxide, newborn, pulmonary arteries, superoxide

## INTRODUCCIÓN

Furchgott y Zawadzki (1980) descubrieron que las células endoteliales producían un factor que inducía relajación en arterias aisladas en respuesta a la acetilcolina (ACh). A esta sustancia o al conjunto de sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio se las denominó EDRF. Posteriormente, Ignarro y cols. (1987), Palmer y cols. (1987) y Furchgott (1988), de manera independiente, demostraron que las acciones fisiológicas y farmacológicas del EDRF podrían ser atribuidas al NO. Actualmente, sabemos que el NO es uno de los principales mediadores fisiológicos endógenos a nivel vascular, que presenta propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas.

El NO posee un electrón desapareado por lo que puede considerarse un radical libre. Por ello, tiene capacidad para reaccionar rápidamente con otras moléculas, que tienen también electrones desapareados, principalmente, otros radicales libres y metales de transición. Por su gran reactividad, el NO tiene una corta semivida, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el organismo, este mediador puede reaccionar con la hemoglobina (Hb), activar la guanilato ciclasa soluble (GCs), o transformarse en peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) tras reaccionar con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

**Mecanismo de la relajación producida por el NO.** El efecto relajante del NO se produce, fundamentalmente, a través de la activación de la GCs, y el consecuente incremento de los niveles del GMPc citosólico en las CMLV (Barnes y Liu, 1995). Una concentración de NO de tan sólo 10 nM es suficiente para activar la GCs. El GMPc reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por medio de diferentes mecanismos (Woodrum y cols., 1999), aunque también se ha descrito que el GMPc induce relajación por mecanismos independientes de cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Karakaki y cols., 1997).

La disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el GMPc puede estar mediada por: a) la activación de la SERCA a través de la fosforilación del fosfolambano, b) la regulación en la fosforilación y activación de la PMCA, c) el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VOC), d) la inhibición de la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS inducido por  $IP_3$  debido a la fosforilación de sus receptores, e) la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , f) la activación de distintos canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , regulados por los niveles celulares de ATP o que presentan rectificación tardía y g) la estimulación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ .

**Papel del NO en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto.** La actividad del NO endotelial pulmonar del cordero (Abman y cols., 1990) y del cerdo (Liu y cols., 1992) aumenta tras el nacimiento (Abman y cols., 1991). La administración de L-NAME, un inhibidor de la síntesis de NO, en ovejas preñadas, produce un aumento del tono arterial pulmonar fetal (Abman y cols., 1990). Si a continuación se practica una cesárea y se suprime la circulación placentaria, se puede observar como aparece una elevación persistente de la presión arterial pulmonar en los fetos tratados con L-NAME, lo que confirma el papel del NO en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto (Fineman y cols., 1995). De hecho, se ha descrito que los principales procesos implicados en la vasodilatación pulmonar postnatal, como el aumento de la  $PaO_2$ , el incremento del flujo sanguíneo y el estiramiento mecánico pulmonar, estimulan la liberación de NO endotelial.

**Fuentes endógenas de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).** Durante el proceso de fosforilación oxidativa se forman ERO con diferente estabilidad en el medio; por ejemplo, el  $O_2^-$  es eliminado a gran velocidad ( $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) por la SOD, mientras que el  $H_2O_2$  es más estable y puede difundir a través de la membrana mitocondrial hacia el citosol. En la membrana plasmática, la fuente enzimática más importante de producción del  $O_2^-$  es la NAD(P)H oxidasa fagocítica, que funciona como un sistema de de-

fensa contra los microorganismos. Este multicomponente enzimático cataliza la transferencia de un electrón para reducir el  $O_2$  a  $O_2^-$ , con la NAD(P)H como donador de electrones a través de la proteína transmembrana citocromo  $b_{558}$  (un complejo heterodimérico de subunidades proteicas  $gp91^{phox}$  y  $p22^{phox}$ ). Recientemente, se ha descrito que la NAD(P)H oxidasa no es exclusiva de las células fagocíticas, puesto que se ha encontrado expresión de la  $p22^{phox}$  en la adventicia de las arterias coronarias (Azumi y cols., 1999).

**Papel fisiopatológico del estrés oxidativo.** Una gran variedad de procesos fisiopatológicos, tales como la hiperglucemia, hiperlipidemia, el estrés hemodinámico o la hipertensión arterial, se han relacionado con niveles elevados de ERO. En condiciones basales, las células regulan la concentración de las ERO por sistemas enzimáticos antioxidantes, tales como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), o la glutatión peroxidasa. Cuando la velocidad de formación de las ERO es mayor que la capacidad neutralizante de los sistemas antioxidantes, se produce una situación de *estrés oxidativo* (Sies, 1999).

Las ERO activan diversas vías de señalización relacionadas con el crecimiento de las CMLV, incluyendo la fosforilación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la inducción de protooncogenes (*c-fos*, *c-myc* y *c-jun*) y la activación del factor de transcripción AP-1. Altas concentraciones de  $H_2O_2$  también se asocian con procesos de apoptosis, que pueden contribuir al remodelado vascular (Touyz, 2000). El  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  pueden polimerizar el ácido hialurónico y regular la actividad de metaloproteasas de la matriz del músculo liso vascular (MMP-2 y MMP-9), que degradan los proteoglicanos y el colágeno, produciendo cambios en la estructura vascular

**Acción de las especies reactivas de oxígeno en el metabolismo del NO.** La vasodilatación dependiente del endotelio está modulada por el balan-

ce entre la concentración del NO y la del  $O_2^-$  (Touyz, 2000). El NO reacciona con el  $O_2^-$  y forma  $ONOO^-$ , reduciendo sus efectos vasodilatadores (Thannickal y Fanburg, 2000). En condiciones normales, la concentración del  $O_2^-$  está controlada por la SOD, que lo transforma en  $O_2$  y  $H_2O_2$  a una velocidad de  $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ . La constante de velocidad de la reacción entre el NO y el  $O_2^-$  para generar  $ONOO^-$  es más rápida ( $6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ), por lo que en situaciones patológicas en que se produce un aumento del  $O_2^-$ , como en la hipertensión arterial, se incrementa la degradación del NO.

**Hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN).** Durante la vida prenatal, la placenta es el órgano encargado de suministrar al feto el oxígeno y los nutrientes. Tras el nacimiento y con la supresión de la circulación placentaria, el pulmón debe realizar la función de intercambio gaseoso. Esta transición conlleva una rápida reducción de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) y un aumento del flujo sanguíneo pulmonar, pasando la circulación pulmonar de ser un circuito del bajo flujo y alta resistencia durante la vida fetal a uno de alto flujo y baja resistencia en el adulto. Cualquier hecho que perturbe esta delicada transición puede conducir al desarrollo de la HPPN. En 1969, Gersony y cols. describieron este cuadro en recién nacidos a término sin cardiopatía. Todos ellos presentaban una presión arterial pulmonar superior a la sistémica y signos de cortocircuito de derecha a izquierda, a través del *ductus arteriosus* y del *foramen ovale*, que conducían a un cuadro de hipoxemia grave. Se ha descrito que la HPPN afecta al 0.1 – 0.5 % de los recién nacidos (Morin y Stenmark 1995) y que la mortalidad oscila entre el 30 y el 40 %.

La HPPN puede ser idiopática o secundaria. La forma idiopática se asocia a una excesiva muscularización del árbol arterial pulmonar, que se inicia antes del parto y que se ve agravada por factores que aparecen durante el mismo o durante los primeros días de vida extrauterina. La HPPN secundaria aparece asociada a cualquier factor que perturbe la ordenada transición de la circulación pulmonar del feto a la del adulto. Sea cual sea su etiología, la HPPN se caracteriza por una elevación de las RVP como consecuencia de un

aumento del tono y/o de cambios en la estructura vascular pulmonar. Este proceso, que puede tener múltiples etiologías, es consecuencia de un desequilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, predominando la acción de estos últimos. Así, la HPPN se ha relacionado con una disminución de la actividad vasodilatadora de la vía del NO/GMPc y/o con un aumento de la actividad vasoconstrictora del tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) y/o de la endotelina-1 (ET-1).

**Tratamiento de la HPPN.** Los objetivos del tratamiento de la HPPN son reducir las RVP, mantener la presión arterial sistólica, interrumpir los cortocircuitos de derecha a izquierda y mejorar la saturación de O<sub>2</sub> arterial y el aporte de O<sub>2</sub> a los tejidos. Puesto que la magnitud del cortocircuito de derecha a izquierda no depende sólo de la presión arterial pulmonar, sino del gradiente de presión entre la arteria pulmonar y la aorta, la vasodilatación del territorio sistémico conduce a un empeoramiento del cortocircuito. Por lo tanto, el fármaco ideal debería ser un vasodilatador con selectividad por el territorio pulmonar.

La terapéutica más eficaz y segura debe ir dirigida a controlar el parámetro hemodinámico específico que produce este proceso; es decir, la elevación de las resistencias vasculares pulmonares. La administración de vasodilatadores pulmonares selectivos permitiría reducir la hipertensión pulmonar, corregir el cortocircuito de derecha a izquierda y disminuir la hipoxemia. Sin embargo, los vasodilatadores clásicamente empleados presentan una baja selectividad pulmonar.

En modelos experimentales o en recién nacidos con HPPN se han utilizado diversos vasodilatadores intravenosos, incluyendo el antagonista de los alfa-adrenoceptores tolazolina, las prostaglandinas PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>1</sub>, el antagonista de Ca<sup>2+</sup> nifedipino, la ACh, el donador de NO nitroprusiato y el ATP. Aunque no existen estudios aleatorizados y comparados con placebo, los da-

tos clínicos disponibles apuntan a que todos estos fármacos presentan una baja selectividad por el territorio pulmonar.

A comienzos / mediados de los años 90, la administración de NO por vía inhalatoria (NOi) demostró una clara selectividad por el territorio pulmonar y creó grandes expectativas. Sin embargo, los estudios clínicos controlados demostraron que la eficacia del tratamiento con NOi era parcial y que hasta un 40-50% de los recién nacidos no respondía al mismo. Recientemente, Finner y Barrington (2000) han realizado un metaanálisis de los estudios controlados y aleatorizados en los que se ha analizado la eficacia del NOi en esta patología. En este metaanálisis se concluye que el NOi aumenta la PaO<sub>2</sub> en 46.4 mm Hg y reduce la utilización de oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO) en un 15% con respecto al grupo control. Sin embargo, la utilización de NOi no redujo la mortalidad en estos estudios. Más recientemente, el estudio NINOS (The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group, 2000) ha demostrado que el NOi no se asociaba con alteraciones en el desarrollo neurológico o de otras complicaciones médicas tras dos años de seguimiento.

Una de las posibles causas de la menor reactividad vascular al NO es el aumento de la inactivación del NO por el O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Diversos factores asociados a la HPPN, tales como la sepsis, el barotrauma, la elevada concentración de O<sub>2</sub> en el aire inspirado u otros factores que estimulan la respuesta inflamatoria conducen a una elevación del estrés oxidativo pulmonar. De hecho, en los últimos años, la alteración de la vía NO/GMPc a nivel pulmonar también se ha correlacionado con un aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, el NOi no está exento de efectos adversos, siendo la metahemoglobina y la formación de ONOO<sup>-</sup> los principales responsables de su toxicidad. Si a todo lo anterior añadimos que la mortalidad en la HPPN sigue siendo elevada (15-30%) y que con frecuencia este cuadro deja secuelas pulmonares y neurológicas irreversibles, es evidente que debemos seguir investigando para obtener nuevas alternativas terapéuticas.



Dado que la selectividad del NO<sub>i</sub> por el territorio pulmonar se basa en su acción local más que en una verdadera selectividad tisular, en los últimos años se ha sugerido que el NO<sub>i</sub> podría sustituirse por otros vasodilatadores administrados por vía inhalatoria. Dentro de los posibles vasodilatadores candidatos a ser empleados destacan la prostaciclina y los dadores de NO. Pero es evidente que el desarrollo de vasodilatadores pulmonares específicos sólo será posible si conocemos los mecanismos que regulan el tono vascular pulmonar y que participan en la respuesta vasodilatadora al NO.

Por todo lo anterior, en la presente trabajo nos propusimos los siguientes **Objetivos**:

1. Analizar la influencia de diversos factores sobre la vasodilatación pulmonar *in vitro* inducida por el NO exógeno, tales como:

- a) la edad postnatal.
- b) el nivel de estrés oxidativo y su origen vascular.
- c) la actividad de la fosfodiesterasa V.

2. Comparar la vasodilatación inducida por el NO exógeno con la de dos donadores de NO, el SNP y el SNAP, analizando las posibles diferencias existentes en:

- a) la liberación de NO, así como la cinética y la potencia de relajación vascular pulmonar.
- b) su mecanismo de acción.
- c) la susceptibilidad a la inactivación por oxihemoglobina y anión superóxido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se han utilizado las arterias procedentes de lechones de raza híbrida Landrace-Largewhite de 1 día y de 2 semanas de edad. Se disecaron las arterias pulmonares de la tercera rama (0.5 – 1.5 mm de diámetro interno) y posteriormente, se eliminaron el tejido conectivo y adiposo que rodeaban las arterias, para después cortar los vasos en anillos de unos 2-3 mm de longitud.

**Registro de contractilidad.** Los anillos arteriales se montaban en cámaras de doble pared termostalizadas a 37 °C, que contenían solución de Krebs-Henseleit, burbujeada con mezcla carbógena (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Los anillos se montaban entre dos alambres de acero inoxidable con forma de L, uno de los cuales se fijaba a la copa y el otro a un transductor isométrico (GRASS Instruments, modelo FT03), acoplado a un preamplificador (GRASS, modelo 7P1JK) y a un amplificador (GRASS, modelo 7DAHJK). La fuerza contráctil se registraba mediante un convertidor analógico-digital (ADInstruments, modelo PowerLab/800). A los anillos se les aplicaba una tensión basal de 0.3 g (arterias pulmonares de animales de 1 día de edad), 0.5 g (arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad). En estas condiciones, las preparaciones se dejaban estabilizar durante un periodo de 60-90 minutos.

**Registro de NO.** Para medir la concentración de NO en la solución de Krebs-Henseleit, se utilizaba un electrodo amperométrico (WPI, modelo ISO-NOP). Para preparar la solución saturada de NO se procedía de la siguiente manera: un vial que contenía 20 ml de solución de Krebs-Henseleit, era burbujeado durante 15 minutos con Slope (95% de N<sub>2</sub>; 5% de CO<sub>2</sub>) y, poste-

riormente, con NO (450 ppm) durante 5 minutos. En estas condiciones, la concentración de NO presente fue de  $8.9 \pm 0.5 \times 10^{-7}$  M (n = 4).

**Eliminación del endotelio.** La eliminación del endotelio se realizaba haciendo pasar un alambre de acero por la luz del anillo y frotándose la pared interna del vaso. La ausencia del endotelio se comprobaba observando la incapacidad de la ACh ( $10^{-7}$  M) para relajar los anillos precontraídos con NA ( $10^{-6}$  M).

**Cambios en la orientación de la adventicia del anillo arterial.** Con el fin de determinar la localización de la fuente generadora del  $O_2^-$ , algunos anillos arteriales se invertían de tal forma que la adventicia quedaba orientada hacia dentro. A otro grupo de anillos se les realizó la maniobra de inversión 2 veces y de esta manera la adventicia quedaba orientada de nuevo hacia fuera.

**Curvas concentración-respuesta a NO.** Al final del periodo de estabilización se añadía al baño de órganos un análogo de  $TXA_2$ , el U46619. El aumento de tensión alcanzaba valores estables al cabo de 20 minutos y, posteriormente, se añadía su correspondiente vehículo. Al cabo de unos 15 minutos se adicionaban volúmenes crecientes de solución saturada de NO, que equivalían a concentraciones crecientes del mismo ( $2 \times 10^{-10}$ ,  $5 \times 10^{-10}$ ,  $2 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ ,  $2 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$  y  $2 \times 10^{-7}$  M).

**Curvas concentración-respuesta a ACh, 8-bromo-GMP cíclico, nitroprusiato sódico (SNP) y SNAP.** Tras el periodo de estabilización se inducía la respuesta contráctil al U46619 ( $10^{-7}$  M). En estas condiciones, se realizaba la curva concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones crecientes y acumulativas de ACh ( $10^{-9}$  M -  $3 \times 10^{-6}$  M), 8-Br-GMPc ( $10^{-5}$  M -  $10^{-3}$  M), SNAP o de SNP ( $10^{-9}$  M -  $3 \times 10^{-5}$  M). Las curvas se realizaron en presencia de vehículo o de alguno de los siguientes fármacos:

A) un inhibidor de la vía NO/GMPc: el ODQ ( $10^{-6}$  M), B) un inhibidor de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA): la tapsigargina ( $2 \times 10^{-6}$  M), C) antioxidantes: SOD (100 U/ml),  $\text{MnCl}_2$  ( $10^{-4}$  M), MnTMPyP ( $10^{-4}$  M), D) prooxidantes: DETCA ( $10^{-3}$  M) o el complejo formado por xantina oxidasa (5 mU/ml)/hipoxantina ( $10^{-4}$  M), E) oxihemoglobina ( $3 \times 10^{-7}$  M), F) inhibidores de las vías enzimáticas que generan el anión superóxido: DPI (difenílene iodonio,  $10^{-5}$  M), L-NAME ( $10^{-4}$  M), indometacina ( $10^{-5}$  M), oxipurinol ( $10^{-7}$  M) o rotenona ( $5 \times 10^{-5}$  M), se realizó para inhibir la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la xantina oxidasa y la cadena de transporte electrónico mitocondrial, respectivamente (Thannickal y Fanburg, 2000).

**Relajación inducida por concentraciones únicas de NO en ausencia y en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa-V, dipiridamol.** Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de la PDE-V sobre el tiempo de recuperación al 50% del efecto relajante del NO ( $t_{1/2}$ ), las preparaciones se pretrataban con dipiridamol ( $10^{-6}$  M). En estos experimentos, se añadía el dipiridamol y 15 minutos después el NO ( $2 \times 10^{-7}$  M).

**Fármacos.** En el presente trabajo se han utilizado los siguientes fármacos: (-) bitartrato de noradrenalina, cloruro de acetilcolina, tapsigargina, 8-bromo-GMPc, nitroprusiato sódico,  $\text{MnCl}_2$ , hipoxantina (HX), xantina oxidasa (XO), DETCA (ácido dietil-ditiocarbámico), nitrito de sodio, estaurosporina, indometacina, oxipurinol, rotenona, DPI (difeníleneiodonio), Hb (de eritrocitos humanos), SOD (superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos) y L-NAME. Todos ellos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., (Alcobendas, España). MnTMPyP (Mn[III] tetrakis [1-metil-4piridil] porfirina), U46619 (9,11 dideoxi-11 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -epoximetano-prostaglandina F2 $\alpha$  disuelto en metil acetato) y SNAP (S-Nitrosol N-acetil-D,L-penicilamina) fueron obtenidos de Alexis Corporation (Läufelfingen, Alemania). El ODQ (1H-[1,2,4,] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-ona) fue obtenido de Tocris Cookson Ltd

(Bristol), el SKF525A de RBI (Smith Kline Beecham, UK) y el AA861 de Takeda (Japón).

**Análisis de los resultados.** Los resultados se expresan como media  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.) para un determinado número de anillos arteriales (n) de distintos animales. Las curvas concentración-respuesta para la acetilcolina, el SNP, el SNAP y se ajustaron la ecuación logística, donde el  $pD_2$  es la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50 % del  $E_{max}$ , expresado como logaritmo negativo de dicha concentración. Las curvas concentración-respuesta a NO se ajustaron a una recta por el método de mínimos cuadrados. A partir de este ajuste se obtuvo el  $pIC_{30}$ . Los resultados experimentales y controles se contrastaron comparando las medias mediante el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía seguido del test de Newman-Keuls. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que la P fue menor de 0.05.

## RESULTADOS

**Efecto vasodilatador del NO y detección simultánea de su concentración.** En animales de dos semanas de edad, una vez que el efecto contráctil del U46619 había alcanzado un valor estable, la adición de concentraciones crecientes de NO producía una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente ( $pIC_{30} = 7.23 \pm 0.03$ ,  $n = 12$ , 1 día de edad). El efecto relajante del NO era inmediato, pero transitorio, puesto que una vez que había alcanzado el efecto máximo, la respuesta contráctil producida por el U46619 se recuperaba paulatinamente en pocos minutos. El NO detectado mediante el electrodo colocado en el baño de órganos desaparecía del medio con una cinética monoexponencial (presentando una semivida de aproximadamente 15 segundos).

**Influencia de la edad sobre el efecto relajante de la acetilcolina en ausencia y presencia de L-NAME.** La acetilcolina producía una relajación concentración-dependiente en las arterias pulmonares de animales de 1 día y de 2 semanas de edad. Los resultados observados con la ACh fueron semejantes a los obtenidos con la administración del NO exógeno. En las curvas concentración-respuesta, se observó como la ACh fue más potente y eficaz en las arterias procedentes de lechones de 2 semanas con respecto a las obtenidas de lechones de 1 día de edad (tabla 1). Cuando se inhibió la producción de NO endógeno tras el pretratamiento con L-NAME ( $10^{-4}$  M), se observó que se producía una inhibición total del efecto relajante de la ACh en preparaciones de animales de 1 día y de 2 semanas de edad.

| <b>Tabla 1. Potencia y eficacia del efecto vasodilatador de acetilcolina en las arterias pulmonares de los lechones de 1 día y de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (<math>10^{-7}</math> M).</b> |                       |                            |              |
|--|-----------------------|----------------------------|--------------|
| <b>pD<sub>2</sub></b>  |                       | <b>E<sub>max</sub> (%)</b> |              |
| 1<br>Día   | 2<br>Semanas          | 1<br>Día                   | 2<br>Semanas |
| 6.60 ± 0.14 (n = 14)   | 7.01 ± 0.05* (n = 11) | 42 ± 6                     | 64 ± 1*      |

\*p<0.05 vs arterias pulmonares de animales de 1 día.

**Evolución con la edad del efecto del 8-Br-GMP cíclico.** El 8-Br-GMPc producía un efecto relajante concentración-dependiente similar en las arterias pulmonares de lechones de 1 día (pIC<sub>30</sub>= 3.92 ± 0.22) y de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (pIC<sub>30</sub>= 3.89 ± 0.21).

**Cambios inducidos por la inhibición de la fosfodiesterasa tipo V.**

En condiciones control, en las arterias pulmonares de lechones de 1 día de edad el tiempo de recuperación del efecto relajante al 50% ( $t_{1/2}$ ) fue de  $1.4 \pm 0.1$  minutos ( $n = 6$ ), mientras que en preparaciones de lechones de 2 semanas de edad la  $t_{1/2}$  fue significativamente mayor ( $2.9 \pm 0.2$  minutos,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ). Cuando las preparaciones de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad se trataban con el dipiridamol, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo V, la  $t_{1/2}$  aumentaba significativamente ( $p < 0.01$ ), alcanzando los valores de  $4.8 \pm 0.2$  minutos ( $n = 9$ ) y  $9.6 \pm 1.1$  minutos ( $n = 8$ ), respectivamente.

**Efecto de diversos agentes antioxidantes y prooxidantes sobre la vasodilatación inducida por el NO.** El pretratamiento con la superóxido dismutasa (SOD) desplazaba la curva de relajación del NO hacia la izquierda tanto en arterias de animales de 1 día ( $pIC_{30} = 7.67 \pm 0.17$ ,  $n = 7$ ) como de 2 semanas de edad (tabla 2). Sin embargo, en éstas últimas, no modificaba la concentración del NO detectado mediante el electrodo con respecto a los valores obtenidos en arterias control. De forma semejante, el mimético de la SOD  $MnCl_2$  potenciaba el efecto relajante del NO en arterias pulmonares de lechones de ambas edades (tabla 6). En las arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad, otro mimético de la SOD, el  $MnTMPyP$ , desplazaba ligeramente hacia la izquierda la curva concentración-respuesta al NO; sin embargo el valor del  $pIC_{30}$  no mostró diferencia significativa con respecto a la curva control (tabla 2) en ningún caso.

| <b>Tabla 2. Parámetros de las curvas concentración-respuesta a NO, SNAP y SNP en presencia de oxihemoglobina y de diferentes agentes antioxidantes o prooxidantes en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (<math>10^{-7}</math> M).</b> |                        |                        |                  |                       |                  |
|--|------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|  | NO                     | SNAP                   |                  | SNP                   |                  |
|  | pIC <sub>30</sub>      | PD <sub>2</sub>        | E <sub>max</sub> | pD <sub>2</sub>       | E <sub>max</sub> |
| Control  | 7.63 ± 0.09<br>(n=14)  | 6.97 ± 0.06<br>(n=10)  | 69 ± 6           | 6.21 ± 0.07<br>(n=10) | 72 ± 9           |
| Oxihemoglobina<br>(3 x10 <sup>-7</sup> M)  | 6.88 ± 0.07**<br>(n=6) | 6.20 ± 0.09**<br>(n=6) | 68 ± 5           | 6.31 ± 0.17<br>(n=6)  | 66 ± 6           |
| SOD<br>(100 U/ml)  | 8.62 ± 0.16*<br>(n=9)  | 7.18±0.11<br>(n=9)     | 77 ± 6           | 5.89 ±0.20*<br>(n=6)  | 79 ± 9           |
| MnTMPyP<br>(10 <sup>-4</sup> M)  | 8.05 ± 0.16<br>(n=5)   | --                     | --               | --                    | --               |
| MnCl <sub>2</sub><br>(10 <sup>-4</sup> M)  | 8.17 ± 0.14*<br>(n=8)  | 7.01 ± 0.11<br>(n=10)  | 76 ± 6           | 5.94±0,33<br>(n=5)    | 64 ± 3           |
| XO (5mU/mL)/<br>HX (10 <sup>-4</sup> M)  | 7.91 ± 0.16*<br>(n=6)  | 6.91 ± 0.11<br>(n=11)  | 98 ± 5           | 5.38±2.31<br>n=10)    | 72 ± 5           |
| DETCA<br>(10 <sup>-3</sup> M)  | 6.66 ± 0.36*<br>(n=8)  | 5.99 ± 0.11*<br>(n=9)  | 95 ± 8*          | 6.01±0.15<br>(n=7)    | 65±11            |

\*p<0.05 control vs tratamiento.

\*\*p<0.01 control vs tratamiento.



En el presente estudio hemos utilizado dos procedimientos experimentales para aumentar la concentración del  $O_2^-$  en el medio de incubación: a) la XO enzima que genera el  $O_2^-$  como producto de la conversión de la HX en ácido úrico y b) el DETCA, el cual inhibe la SOD. El bloqueo de la SOD tras la administración del DETCA ( $pIC_{30} = 6.05 \pm 0.17$ ,  $n = 7$ ) o del complejo XO/HX ( $pIC_{30} = 6.0 \pm 0.22$ ,  $n = 6$ ) producía una inhibición significativa del efecto relajante del NO en las arterias pulmonares de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad (tabla 2). Cuando analizábamos la concentración de NO detectado por el electrodo, podíamos observar que el DETCA no modificaba la detección con respecto al valor control, mientras que el complejo XO/HX lo disminuía de manera significativa.

**Efecto del DPI, L-NAME, indometacina, oxipurinol, SKF525A, AA861 y la rotenona sobre la vasodilatación inducida por el NO.** El DPI desplazaba hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a NO, reduciendo de forma significativa el valor del  $pD_2$  tanto en las arterias pulmonares de los lechones de 1 día ( $pIC_{30} = 7.5 \pm 0.05$ ,  $n = 5$ ), como en las obtenidas de los animales de 2 semanas de edad ( $pIC_{30} = 8.13 \pm 0.03$ ,  $n = 5$ ). Los restantes inhibidores enzimáticos ensayados, no modificaban el efecto relajante del NO de manera significativa en las arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad. Por el contrario, como muestra la figura 1, en las arterias pulmonares procedentes de los lechones de 1 día de edad, la indometacina potenciaba el efecto relajante del NO de manera significativa. Sin embargo, el pretratamiento con indometacina no modificaba la respuesta vasodilatadora del NO en arterias pulmonares procedentes de lechones de 2 semanas de edad (figura 1). También se observó en arterias pulmonares procedentes de los lechones de 1 día de edad una potenciación del efecto del NO con el pretratamiento con otro inhibidor de la COX, el meclofenamato ( $10^{-5}$  M) y con el inhibidor selectivo de la COX-1, el ácido acetilsalicílico ( $5 \times 10^{-5}$  M). Sin embargo, el

inhibidor selectivo de la COX-2 (NS398,  $10^{-5}$  M) no produjo cambios significativos.

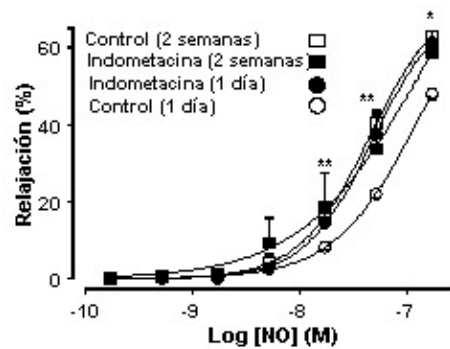


Figura 1. Efecto relajante del NO en las arterias pulmonares sin endotelio de los lechones de 1 día y de 2 semanas de edad, pretratadas con indometacina ( $10^{-5}$ M). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.e.m. de 6-14 experimentos. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  arterias control vs arterias tratadas con indometacina (animales de 1 día).

**Efecto de los cambios en la orientación de la adventicia del anillo arterial.** En el grupo de experimentos realizado en arterias pulmonares invertidas, las curvas concentración-respuesta a NO se desplazaron hacia la iz-

quiera. Este hecho se observó tanto en las preparaciones de los animales de 1 día ( $pIC_{30} = 7.90 \pm 0.08$ ,  $n = 6$ ), como en las de los de 2 semanas de edad ( $pIC_{30} = 8.25 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ). En estas arterias invertidas, al contrario de lo que se observaba con los respectivos controles, el pretratamiento con DPI no modificaba las curvas de relajación al NO. Sin embargo, en aquellos anillos en los que se realizó la doble maniobra de inversión, la curva concentración-respuesta a NO, no fue distinta de la observada en las arterias control.

**Cinética de la relajación producida por el NO, SNAP y SNP en las arterias pulmonares de lechón.** En la figura 2 se muestra cómo el NO producía su efecto vasodilatador máximo antes que los donadores de NO y cómo la recuperación de la contracción era también más rápida ( $26 \pm 2$  s,  $n = 3$ ). La respuesta vasodilatadora máxima del SNP era la más lenta y también la que más tardaba en recuperarse ( $250 \pm 12$  s,  $n = 3$ ). Mientras que la cinética de la respuesta del SNAP ( $86 \pm 8$  s,  $n=3$ ). se encontraba situada entre la del NO y la del SNP.

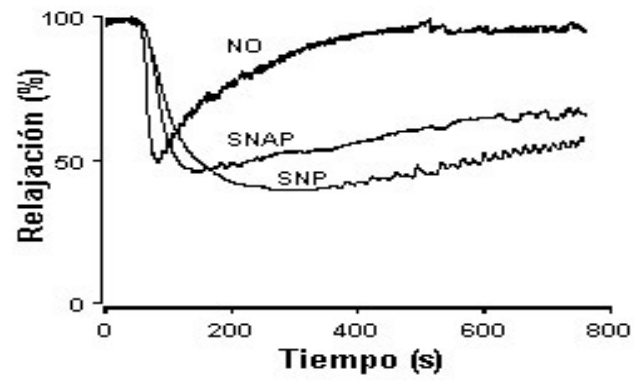
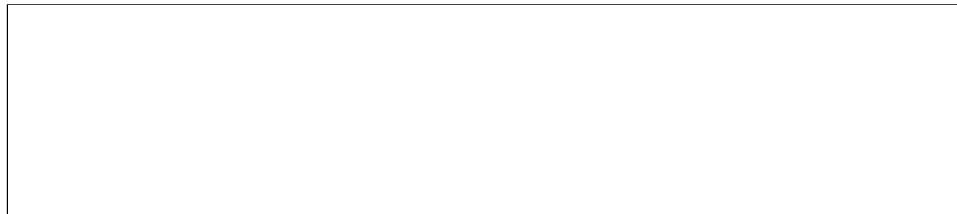
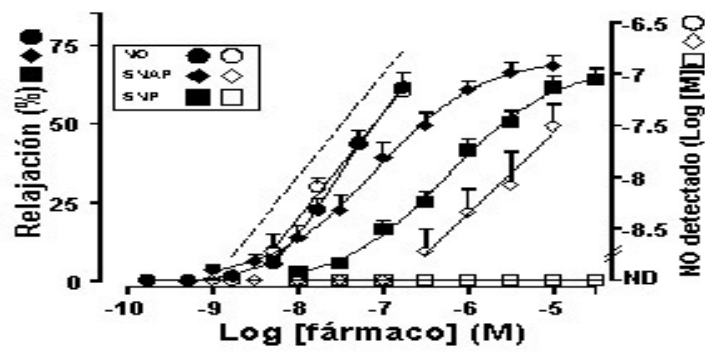


Figura 2. Curso temporal del efecto relajante del NO comparado con el de los donadores de NO, SNAP y SNP, en las arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.

**Comparación del efecto relajante del NO respecto al producido por los donadores de NO, SNAP y SNP, en las arterias pulmonares de lechón.** Ambos donadores (SNAP y SNAP producían un efecto relajante concentración-dependiente alcanzándose un efecto máximo semejante (figura 3 y Tabla 2). Con respecto a la potencia, se puede observar cómo el NO, es ligeramente más potente que el SNAP, y éste a su vez más potente que el SNP. Sólo se detectaba NO cuando se añadían concentraciones de SNAP superiores a  $10^{-7}$  M, aunque a esas concentraciones producía una relajación de casi un 40% de la contracción. La adición del SNP produjo vasodilatación a concentraciones superiores a  $10^{-8}$  M, no detectándose aumentos en la concentración de NO.



**Mecanismos de vasodilatación del NO, SNAP, y SNP en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.**

Con el fin de analizar la participación de la GCs en el mecanismo de relajación producida por el NO, el SNAP y el SNP, realizamos las correspondientes curvas concentración-respuesta en presencia de ODQ ( $10^{-6}$  M). En arterias pulmonares de lechón, se ha descrito que la activación de la SERCA es uno de los mecanismos de relajación del SNP (Cogolludo y cols., 2001); por esta razón, realizamos también curvas concentración-respuesta a NO, a SNAP y a SNP en presencia de tapsigargina ( $2 \times 10^{-6}$  M), un inhibidor de la SERCA. El ODQ eliminaba casi completamente el efecto relajante del NO, del SNAP y del SNP (figura 31). En presencia de tapsigargina, el efecto vasodilatador del NO se inhibió a casi todas las concentraciones estudiadas. De forma similar, la tapsigargina inhibió los efectos relajantes del SNP y del SNAP. Los parámetros referentes a la potencia de relajación y eficacia del SNP, del SNAP y del NO en ausencia y presencia de los tratamientos mencionados, se muestran en la tabla 3.

| <b>Tabla 3. Parámetros de las curvas concentración-respuesta a NO, a SNAP y a SNP en presencia de tapsigargina en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.</b> |                          |                          |                  |                         |                  |
|---|--------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
|   | NO                       | SNAP                     |                  | SNP                     |                  |
|   | pIC <sub>30</sub>        | pD <sub>2</sub>          | E <sub>max</sub> | pD <sub>2</sub>         | E <sub>max</sub> |
| Control   | 7.63 ± 0.09<br>(n = 14)  | 6.59 ± 0.11<br>(n = 10)  | 70 ± 5           | 6.21 ± 0.07<br>(n = 10) | 72 ± 9           |
| Tapsigargina<br>( $2 \times 10^{-6}$ M)   | 7.17 ± 0.04*<br>(n = 11) | 6.17 ± 0.21**<br>(n = 6) | 46 ± 9*          | 6.0 ± 0.18<br>(n = 7)   | 48 ± 9*          |

\*p<0.05 control vs tratamiento.

\*\*p<0.01 control vs tratamiento.

**Efectos de la oxihemoglobina, la SOD, el  $MnCl_2$ , el complejo XO/HX y el DETCA sobre la vasodilatación inducida por el NO, SNAP y SNP en las arterias pulmonares de lechón.** Como se observa en la figura 4, la oxihemoglobina produjo una marcada inhibición de la respuesta a NO. Sin embargo, no afectó a la respuesta a SNP y sólo débilmente a la respuesta a SNAP. Los resultados obtenidos con el DETCA, el complejo XO/HX, la SOD y el  $MnCl_2$  sugieren que la reducción del efecto vasodilatador del NO fue debida al aumento del  $O_2^-$ . Por el contrario, el aumento del efecto vasodilatador pudo ser debido a la disminución del  $O_2^-$ . Este hecho nos indicaría que en nuestras condiciones experimentales, el  $O_2^-$  presente en el medio de incubación reaccionaría con el NO y de esta forma disminuiría su efecto vasodilatador. Por esta razón, decidimos comparar el efecto vasodilatador del NO con el de los donadores de NO en presencia de agentes prooxidantes y antioxidantes.



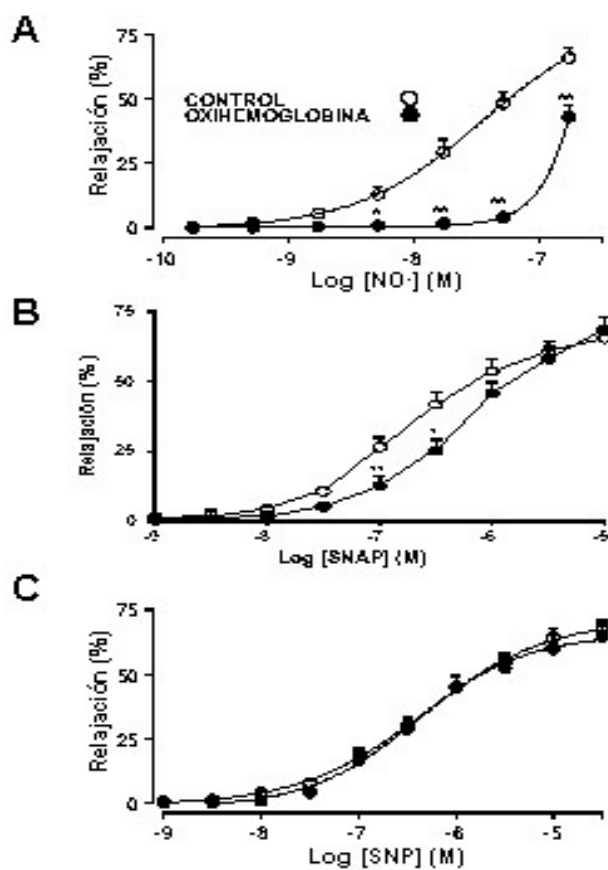
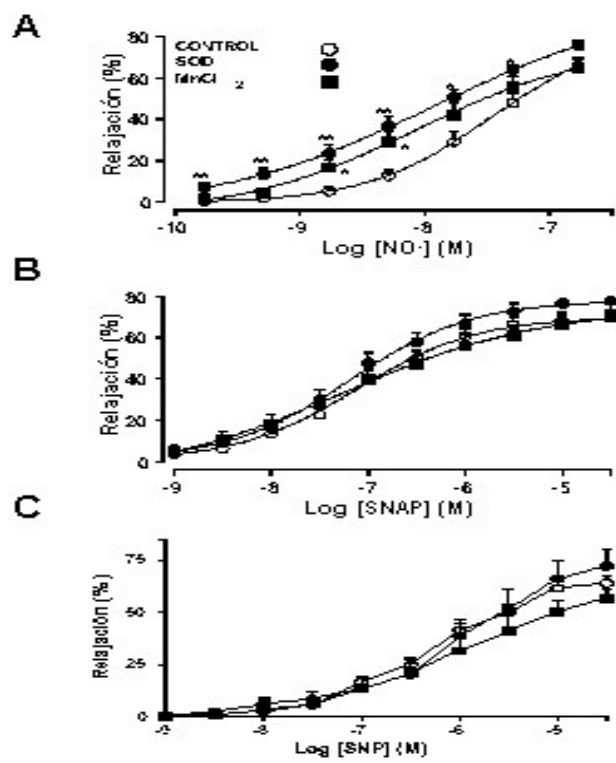


Figura 4.- Efecto relajante del NO (**A**) comparado con el producido por dos donadores de NO, el SNAP (**B**) y el SNP (**C**), en arterias pulmonares de lechón de 2 semanas de edad contraídas con U46619 ( $10^{-7}$ M) y pretratadas con oxihemoglobina ( $3 \times 10^{-7}$  M). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.e.m de 5-14 experimentos (ver Tabla 6). \* $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  control vs oxihemoglobina

Tanto la SOD como su mimético, el  $\text{MnCl}_2$ , no modificaban la curva concentración-respuesta al SNAP y SNP (figura 5), pero sí que potenciaban la vasodilatación producida por el NO. En presencia del complejo XO/HX, o tras la inhibición de la SOD con el DETCA, el efecto vasodilatador se inhibió de forma significativa. La curva concentración-respuesta al SNAP se desplazó ligeramente hacia la derecha tras el tratamiento con DETCA y se acompañó de una reducción significativa del valor del  $\text{pD}_2$ . Sin embargo, no se observaban cambios tras la administración del complejo XO/HX. Ninguno de estos pretratamientos modificó la curva concentración-respuesta al SNP (tabla 2).





## DISCUSIÓN

**Modelo experimental: lechones de 1 y 15 días de vida.** Nuestros experimentos se realizaron en arterias pulmonares de lechón, ya que la especie porcina es ampliamente utilizada como modelo experimental de distintas patologías a nivel pulmonar, incluyendo la HPPN. De hecho, el desarrollo anatómico y funcional pulmonar porcino durante el periodo perinatal es muy similar al del humano (Sánchez-Luna y cols., 1993). La elección de animales de 1 día de vida se debe a que durante esta etapa, los recién nacidos son más susceptibles a desarrollar la HPPN. A los 15 días de vida, los animales, aunque siguen siendo considerados recién nacidos (en el hombre se considera recién nacido a un individuo de hasta 28-30 días de edad), su desarrollo pulmonar extrauterino está más avanzado y muestra ya un patrón intermedio entre el del recién nacido y el del adulto. En el presente estudio se han utilizado exclusivamente animales machos con el fin de minimizar la posible variabilidad entre sexos.

**El TXA<sub>2</sub> como vasoconstrictor pulmonar: mecanismo y papel fisiopatológico.** Durante la vida fetal, el TXA<sub>2</sub> contribuye a la regulación del tono vascular pulmonar y al mantenimiento de la alta resistencia vascular pulmonar necesaria para la fisiología fetal, pero sin duda, más que en situaciones fisiológicas, el TXA<sub>2</sub> desempeña un papel fundamental en situaciones patológicas asociadas a alteraciones pulmonares y en particular a la HPPN,

tanto en modelos experimentales como en la clínica. En los vasos estudiados en el presente estudio, la respuesta contráctil inducida por el análogo de TXA<sub>2</sub> (U46619) era mayor en las preparaciones de animales de 2 semanas con respecto a las de los de 1 día de edad. Las diferencias observadas en la vasoconstricción inducida por el U46619 entre animales de 1 día y de dos semanas de edad podrían estar relacionadas con el hecho de que estos últimos presentaban una mayor masa muscular.

Los receptores activados por TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (receptores TP) pertenecen a la familia de los receptores de membrana acoplados a proteína G. La activación de dichos receptores conlleva una activación de la fosfolipasa C con el consiguiente aumento de IP<sub>3</sub> y de DAG. La movilización del Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares por efecto del IP<sub>3</sub>, así como su entrada por los canales VOC y ROC da lugar a un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> necesario para que se produzca la respuesta vasoconstrictora (Cogolludo, 1999). No obstante, también se han descrito mecanismos de contracción independientes del aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, que implican un aumento en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca<sup>2+</sup> (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997).

**Significado del NO detectado por el electrodo.** La semivida del NO en el baño de órganos es muy breve, inferior a 15 s, haciendo difícil que se acumule en la solución, aunque se administren exógenamente cantidades de forma continuada. A pesar de que el límite de detección del NO por el electrodo sea relativamente bajo (1 nM según el fabricante y alrededor de 10 nM en la práctica), lo cierto es que no permite detectar la producción de NO endógeno, a menos que se introduzca el electrodo en la luz del vaso a una distancia muy corta de las células endoteliales. Asimismo, el electrodo no permite detectar los cambios en la concentración de NO, secundarios a alteraciones en el metabolismo, que ocurren dentro del tejido. Por lo tanto, el electrodo detectará el NO añadido y el liberado espontáneamente por donadores de NO al medio, pero no el NO generado por el tejido o los cambios en la concentración de NO que ocurran dentro del mismo. Resumiendo, en princi-

pio, el campo de detección del electrodo se limita a aquellos cambios en la concentración de NO que tienen lugar en el baño de órganos.

**Papel del NO endógeno.** La administración de L-NAME, un inhibidor de la NOS, produce una respuesta vasoconstrictora en las arterias pulmonares, lo que indica que el NO es liberado por el endotelio en condiciones basales en concentración suficiente para modular el tono vascular. Por otra parte, en todos los tejidos estudiados de animales de ambas edades, la relajación inducida por ACh fue inhibida de forma casi completa por el L-NAME, lo que indica que el efecto relajante dependiente del endotelio está mediado, mayoritariamente, por la liberación de NO. Es decir, el NO desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular *in vitro*, tanto en situación basal como tras el estímulo con agonistas. Estos datos están en concordancia con los observados *in vivo* por Abman y cols. (1990) en fetos y recién nacidos de cordero.

**Mecanismo de acción del NO.** Existen múltiples mecanismos implicados en la vasodilatación producida por el NO y/o el GMPc. La existencia de mecanismos redundantes indica la importancia de esta vía de vasodilatación. Sin embargo, la importancia relativa de cada uno es distinta según el lecho vascular. Por ello, es necesario caracterizar el papel que desempeña cada mecanismo en el vaso objeto de estudio. El NO produce vasodilatación, fundamentalmente, a través de la estimulación de la GCs con el consiguiente aumento de los niveles de GMPc (Cogolludo y cols., 2001). No obstante, también se han descrito mecanismos de vasodilatación del NO independientes de GMPc (Woodrum y cols., 1999). Así, por ejemplo, el NO puede activar directamente canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ) e hiperpolarizar las células musculares lisas vasculares. En las arterias pulmonares de lechón, ya se había observado previamente que el SNP aumentaba unas tres veces la concentración de GMPc, y su efecto vasodilatador se inhibía casi completamente con ODQ (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). En

nuestros experimentos, observamos que el ODQ también produjo una marcada inhibición de la respuesta vasodilatadora al NO, indicando que la GCs es el principal mecanismo responsable de los efectos vasodilatadores del NO en las arterias pulmonares de lechones recién nacidos. El GMPc produce vasodilatación por mecanismos tanto dependientes como independientes de la  $[Ca^{2+}]_i$  que, en general, dependen de la activación de la PKG y la fosforilación de múltiples dianas que ésta produce. Los mecanismos independientes de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que implican una reducción en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $Ca^{2+}$  no son bien conocidos. Se han descrito cambios en la actividad de la MLCK, pero también posiblemente está implicada la fosforilación de otras proteínas como la *heat shock related protein* de bajo peso molecular o incluso cambios en el acoplamiento de las proteínas contráctiles con el citoesqueleto celular (Woodrum y cols., 1999). Dentro de los mecanismos dependientes de la  $[Ca^{2+}]_i$ , se han propuesto como dianas del GMPc múltiples mecanismos directa o indirectamente relacionados con la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Cogolludo, 1999). En arterias pulmonares de lechón se había observado previamente que la vasodilatación inducida por SNP se inhibía marcadamente por taspigargina, mientras que otros mecanismos, incluyendo el bloqueo de canales de  $K^+$ , de  $Ca^{2+}$  o de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , no parecen jugar ningún papel (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997; Cogolludo y cols. 2001). Creemos que en nuestras condiciones experimentales, la vasodilatación producida por el NO en las arterias pulmonares de lechón, implica la estimulación de la GCs, el aumento del GMPc, la activación de la SERCA y una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Papel de las fosfodiesterasas.** El efecto del NO es transitorio y después de producir una relajación máxima, de forma espontánea se recupera la tensión inducida por el U46619. La desaparición del efecto del NO puede ser atribuida, en parte, a la disminución de la concentración de NO en el medio de incubación. Sin embargo, cuando se registra de forma simultánea la concentración de NO y la tensión se puede observar que cuando la concentración

de NO ha regresado a sus niveles basales, la fuerza contráctil aún no se ha recuperado completamente. Este retraso en la recuperación de la fuerza contráctil con respecto a la concentración de NO puede ser debido a que persiste un aumento en los niveles intracelulares de GMPc. Los nucleótidos cíclicos se degradan por fosfodiesterasas. La PDE-V es específica para el GMPc y se expresa de forma importante a nivel vascular pulmonar. Por ello, realizamos experimentos en presencia de dipiridamol, y en contra de lo que habíamos obtenido previamente con el SNP (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997), el análisis de la curva concentración-respuesta demostró que el dipiridamol no potenciaba de forma significativa la respuesta vasodilatadora. Sin embargo, un análisis más detallado indicaba que el dipiridamol prolongaba el efecto vasodilatador del NO. Estos datos, junto con los obtenidos previamente con SNP, sugieren que la duración, pero no la magnitud, del efecto del NO depende de la capacidad metabólica de las células para degradar al GMPc generado. Sin embargo, si las concentraciones de NO se mantienen de forma más prolongada, p. ej., empleando un donador de NO, se aumenta no sólo la duración, sino también la magnitud del efecto vasodilatador del NO.

**Papel del estrés oxidativo.** La vasodilatación dependiente del endotelio está modulada por el balance de la concentración de NO y del  $O_2^-$ . El NO reacciona con el  $O_2^-$  y forma  $ONOO^-$ , que depende del NO e inhibe sus efectos vasodilatadores (Thannickal y Fanburg, 2000). Además, se ha descrito que algunos modelos de hipertensión pulmonar (Steinhorn y cols., 2001) están asociados a un aumento de las ERO. Por esta razón decidimos estudiar en nuestras condiciones experimentales el efecto del estrés oxidativo sobre la respuesta al NO en arterias pulmonares de lechón. Para ello, hemos utilizado diversas herramientas farmacológicas que sabemos que modifican el *status* del estrés oxidativo: SOD (transforma el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ ),  $MnCl_2$  y  $MnTMPyP$  (miméticos de la SOD), complejo XO/HX (sistema generador de superóxido) y DETCA (inhibidor de la SOD) (Wang y cols., 1998). En las arterias pulmonares, tanto de animales de 1 día como de los de 2 semanas de edad, observamos que la disminución en la concentración del  $O_2^-$  tras la adición de



SOD o  $\text{MnCl}_2$  potenciaba el efecto del NO. Por el contrario, el aumento en los niveles del  $\text{O}_2^-$  inducido tras la adición del sistema XO/HX o de DETCA reducía el efecto vasodilatador del NO. Con respecto a la concentración de NO detectada por el electrodo se observó que el sistema XO/HX disminuyó la concentración de NO en el medio, mientras que el DETCA, el  $\text{MnCl}_2$  y la SOD no modificaron dicha concentración. Como comentamos anteriormente, el electrodo detecta aquello que ocurre en el baño y que, en principio, es ajeno al tejido. La reducción del efecto relajante y de la concentración de NO producida por el sistema XO/HX indica que el  $\text{O}_2^-$  generado inactiva rápidamente al NO durante el proceso de difusión en el baño de órganos, inhibiendo de esta forma su acción sobre el músculo liso vascular. El hecho de que el DETCA redujera la relajación inducida por NO sin modificar la concentración del NO detectado por el electrodo, indica que el incremento en los niveles del  $\text{O}_2^-$  tras la inhibición de la SOD queda restringido solo al tejido. La administración de la SOD o del  $\text{MnCl}_2$  incrementó el efecto vasodilatador del NO pero sin modificar la concentración del NO detectado. Estos resultados indicarían que en nuestras condiciones experimentales se estaría produciendo el  $\text{O}_2^-$  en el tejido a una concentración suficiente para inactivar el NO agregado exógenamente y que el catabolismo del  $\text{O}_2^-$  se encuentra potenciado cuando se administra el mimético permeable de la SOD. El hecho de que la SOD, que no atraviesa la membrana, administrada exógenamente potencie el efecto relajante del NO indicaría que parte del  $\text{O}_2^-$  endógeno (el cual inactiva al NO) podría ser extracelular. Sin embargo, la inactivación del NO dependiente del  $\text{O}_2^-$  endógeno estaría restringida al área perivascular y, por lo tanto, la protección del NO por la SOD no sería detectable por el electrodo. Por todo lo anterior, podemos proponer que el efecto vasodilatador del NO está modulado por el nivel del  $\text{O}_2^-$  generado endógenamente por las arterias pulmonares. A su vez, la concentración del  $\text{O}_2^-$  a nivel tisular puede modularse farmacológicamente, tanto en sentido de aumento como de disminución, modificando, por tanto, la respuesta al NO. La difusión del  $\text{O}_2^-$  no está restringida a la célula concreta que lo ha producido, sino que probablemente afecta también a las

células adyacentes. Sin embargo, la producción y difusión del  $O_2^-$  endógeno no es suficiente para afectar a la concentración de NO en el baño de órganos.

**Fuente del  $O_2^-$  en el tejido.** Los principales sistemas enzimáticos generadores del  $O_2^-$  son: la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico (Thannickal y Fanburg, 2000). Para estudiar la influencia de estos sistemas enzimáticos se han utilizado el DPI, el L-NAME, la indometacina, el AA861, el SKF 525A, el oxipurinol y la rotenona (que inhiben la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico respectivamente) (Wang y cols., 1998; Fanburg y Thannickal, 2000). Para determinar el o los sistemas enzimáticos que intervienen en la producción del  $O_2^-$  capaz de inactivar el NO en las arterias pulmonares de lechón, realizamos las curvas concentración-respuesta al NO en presencia de estos inhibidores enzimáticos. Tanto en arterias de animales de 1 día como de 2 semanas de edad, el DPI potenciaba la relajación inducida por el NO. El DPI también puede inhibir el complejo I de la cadena respiratoria, pero el hecho de que el inhibidor más específico de este complejo, la rotenona, no modificara la respuesta al NO sugiere que la potenciación de la respuesta producida por el DPI es debido a su efecto inhibitor sobre la NAD(P)H oxidasa. Por tanto, la NAD(P)H oxidasa de la membrana es una fuente importante de producción del  $O_2^-$  en arterias pulmonares de lechón, tal y como se ha descrito en otros vasos (Wang y cols., 1998). Por el contrario, el L-NAME, el AA861, el SKF 525A, el oxipurinol y la rotenona no modificaron de manera significativa el efecto vasodilatador del NO, lo que sugiere que la NOS, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico no contribuyeron de manera importante a la inactivación del NO. En arterias pulmonares de animales de un día, pero no de 2 semanas de edad, la indometacina potenció el efecto vasodilatador del NO, lo que sugiere que la COX podría ser también una fuente del  $O_2^-$  que inactiva al NO. Como posibilidad alternativa, otros metabolitos

de la COX podrían de alguna manera inhibir el efecto vasodilatador del NO. En el momento actual, nuestros resultados no nos permiten distinguir entre ambas posibilidades. Dado que observamos una potenciación del efecto vasodilatador del NO con la aspirina, que a la concentración de  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  es un inhibidor relativamente selectivo de la COX-1 inhibidores mientras que con el inhibidor de la COX-2 NS398 no observaron cambios significativos, la isoforma responsable parece ser la COX-1.

Como hemos mencionado anteriormente, nuestros resultados indican que la NAD(P)H oxidasa de la membrana es una fuente importante de generación del  $\text{O}_2^-$  a nivel del tejido vascular pulmonar. Por esta razón decidimos realizar experimentos que nos condujeran a la localización de la NAD(P)H oxidasa en el tejido. Se ha descrito que en aorta de rata (Wuang y cols., 1998) y en arteria pulmonar de conejo (Steinhorn y cols., 1994), se localiza principalmente en la adventicia. Para determinar si la localización de la fuente del  $\text{O}_2^-$  en nuestras preparaciones era también la adventicia diseñamos una serie de experimentos en anillos arteriales invertidos, es decir, con la adventicia orientada hacia adentro. Como controles para este procedimiento de inversión en estos experimentos se utilizaron anillos doblemente invertidos, es decir, con la misma orientación que los anillos intactos. En arterias con la adventicia orientada hacia adentro (anillos invertidos), el efecto vasodilatador del NO fue mayor que el inducido en los anillos intactos y que en los anillos doblemente invertidos. Estos resultados sugieren que la principal fuente del  $\text{O}_2^-$  está localizada en la adventicia y que ésta actuaría como una *barrera química* para el NO. Es decir, que en anillos arteriales normales, el NO administrado exógenamente debe cruzar la adventicia para llegar a la célula muscular lisa y durante este trayecto podría ser inactivado, disminuyendo, su efecto vasodilatador.

Cuando los anillos invertidos fueron tratados con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI, el efecto relajante del NO fue similar al observado en ausencia de DPI. Estos resultados apoyan que el efecto de la inversión del anillo arterial, es debido a una menor inactivación del NO y que la localización principal de la NAD(P)H oxidasa está en la adventicia. Resultados simi-

lares han sido descritos por Steinhorn y cols. (1994). De hecho, Wuang y cols. (1998) han demostrado que las proteínas gp19phox, p22phox, p47phox y p67phox, subunidades de la NAD(P)H oxidasa, están exclusivamente localizadas en la capa adventicia de la aorta de rata.

**Cambios con la edad postnatal.** En apartados precedentes hemos considerado las características de la vasodilatación inducida por el NO, comentando brevemente las diferencias observadas entre los animales de 1 día y de 2 semanas de edad. Por ello, en este apartado, trataremos de analizar estas diferencias.

Los cambios en la vía NO/GMPc durante el periodo perinatal se han correlacionado con la progresiva disminución de las RVP que tiene lugar en el momento del nacimiento y durante los primeros días de vida. Así, cuando el feto ha estado expuesto a inhibidores de la NOS durante los últimos días *in utero*, la caída de resistencias vasculares está marcadamente reducida y sufre HPPN (Fineman y cols., 1995). En arterias pulmonares, la relajación endotelio-dependiente inducida por ACh, aumenta con la edad postnatal en conejos, corderos y cerdos (Liu y cols., 1992). Nuestros resultados con ACh confirman estos hallazgos, puesto que las preparaciones de animales de 2 semanas presentaron un efecto relajante mayor que el observado en las arterias procedentes de animales de un día de edad. Estas diferencias se han atribuido principalmente a cambios a nivel endotelial y, en particular, a la expresión de la eNOS. Uno de los argumentos para excluir posibles alteraciones a nivel de las CMLV ha sido la ausencia de cambios con la edad en la respuesta al SNP (Liu y cols., 1992). En nuestros experimentos con arterias pulmonares observamos un claro paralelismo entre la respuesta vasodilatadora a ACh y a NO exógeno (figura 13A y 14A), lo que sugiere que las diferencias no están relacionadas con cambios a nivel endotelial. Sin embargo, el efecto relajante producido por el 8-bromo-GMPc, un análogo del GMPc, no se modificó con la edad, indicando que los cambios con la edad no parecen estar relacionados con alteraciones en la señal de transducción más allá de la síntesis de GMPc.

En base a la evolución en la respuesta a ACh, NO y 8-bromo-GMPc, pensamos que las diferencias podrían ser atribuibles a cambios en el estado oxidativo, tal y como había sido descrito en conejos por Morecroft y cols. (1998). Sin embargo, en nuestros experimentos no observamos cambios en el efecto potenciador de la SOD, ni alteraciones en la respuesta a otros agentes que modulan el estado oxidativo, tales como el  $MnCl_2$ , el DETCA o la XO/HX. Más aún, tampoco observamos cambios en la respuesta a DPI, oxipurinol, rotenona y L-NAME o tras la inversión de las arterias pulmonares. Sin embargo, en presencia de indometacina, meclofenamato y aspirina las curvas concentración-respuesta a NO de preparaciones de animales de 1 día de edad se desplazaron hacia la izquierda, desapareciendo las diferencias en la respuesta a NO entre las preparaciones de animales 1 día o de 2 semanas de edad; este resultado sugiere que estas diferencias podrían ser secundarias a cambios en la actividad de la COX-1. Como se apuntó anteriormente, el mecanismo por el que un aumento de la actividad de la COX inhibe la respuesta al NO es desconocido. Sin embargo, podríamos especular que en las arterias pulmonares de animales de 1 día de edad otra fuente de producción del  $O_2^-$  (diferente a la NAD(P)H oxidasa) sería la COX-1. También estos resultados indicarían que la menor potencia del NO en arterias pulmonares procedentes de animales de 1 día con respecto a la de las 2 semanas de edad, estaría relacionada con el estrés oxidativo inducido por la COX-1.

#### **NO *versus* donadores de NO.**

**Mecanismo de acción** Dado que los donadores de NO necesitan liberar el NO para inducir su efecto vasodilatador, es de esperar que una vez liberado éste, el mecanismo de vasodilatación sea similar al del NO. Sin embargo, en la aorta de rata, se ha observado que el efecto del NO y de los donadores de NO puede presentar distinta susceptibilidad a su inhibición por el ODQ. Aunque en general se suele asumir que el SNAP y el SNP ejercen sus efectos vasodilatadores a través de la liberación de NO, es importante tener

en cuenta que el SNAP y el SNP pueden producir una respuesta vasodilatadora independiente de la liberación de NO. Así, se ha descrito que los nitrosioles (como el SNAP) activan directamente la GCs (Tseng y cols., 2000), mientras que el SNP, además libera cianuro, el cual ejerce efectos múltiples, incluyendo la activación de la GCs. Es posible que estos efectos pudieran contribuir a explicar el efecto diferencial de ODQ descrito por Tseng y sus colaboradores (2000). Sin embargo, en nuestras preparaciones observamos que los efectos inhibitorios tanto de ODQ como de taspigargina sobre la vasodilatación inducida por el NO y los donadores de NO eran muy similares, lo que indica que el mecanismo de acción es común y sugiere que los efectos de los donadores de NO están exclusivamente mediados por la liberación de NO. En su conjunto, todos estos datos nos indican que el NO, el SNAP y el SNP, ejercen su efecto vasodilatador exactamente por el mismo mecanismo de acción y, por tanto, las diferencias que puedan encontrarse en cuanto a la modulación de sus efectos deberán estar relacionadas con las características de la liberación del NO (mecanismos o localización).

**Cinética, potencia y duración de los efectos.** La cinética y la potencia de los efectos vasodilatadores del NO gaseoso, del SNAP y del SNP resultaron ser muy distintas. El NO produjo un rápido efecto vasodilatador, mientras que el SNAP y, particularmente, el SNP, produjeron respuestas vasodilatadoras más lentas. Estos resultados sugerían que la velocidad a la que se alcanzaban las concentraciones efectivas de NO a nivel de la GCs fuese más rápida para el NO gaseoso, que sólo depende de la velocidad de difusión del gas en el medio. Sin embargo, el SNAP y el SNP exhibieron una cinética de liberación de NO intermedia y lenta respectivamente. En línea con estos hallazgos, la potencia del NO fue mayor que la del SNAP y ésta, a su vez, fue mayor que la del SNP, lo que también es un reflejo de la cinética más rápida de liberación de NO. Sin embargo, la duración de los efectos estaba inversamente relacionada con la velocidad de liberación de NO. Por tanto, a mayor velocidad de liberación de NO, más rápido aparecerá el efecto, mayor será la

potencia del fármaco pero también más rápido se consumirá y mas corta será la duración de los efectos.

**Liberación de NO.** Como se ha mencionado anteriormente, nuestros resultados demuestran que en las arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad, el efecto vasodilatador del NO es proporcional a la concentración de NO detectado por el electrodo. Con el SNAP el efecto relajante se presentó a partir de concentraciones bajas ( $3 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-7}$  M), mientras que sólo cuando se administraron concentraciones altas ( $3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$  M) se pudo detectar un aumento en los niveles de NO en el baño con el electrodo. Estos resultados son congruentes con los descritos en plaquetas aisladas determinando los niveles de NO mediante la conversión de la oxihemoglobina en metahemoglobina. El SNP indujo un efecto vasodilatador dependiente de la concentración, pero no se detectaron cambios en los niveles de NO en el baño. Estos resultados indican que: a) el SNAP puede liberar NO al baño, aunque la mayor cantidad de NO se libera dentro del tejido donde induciría la respuesta vasodilatadora, mientras que la liberación de NO por el SNP ocurre solo en el tejido y no en el baño. b) el SNP no libera NO de forma espontánea sino tras activación metabólica, tal y como ha sido descrito anteriormente en otros tejidos vasculares.

**Efecto de la oxihemoglobina.** Nuestros resultados, también demuestran que la oxihemoglobina no modificó el efecto relajante del SNP y que inhibió ligeramente el efecto del SNAP, mientras que inhibió casi completamente el efecto vasodilatador del NO exógeno. Puesto que el NO reacciona con la oxihemoglobina de forma irreversible y con una estequiometría 1:1, cuando las concentraciones de NO se aproximan a las de oxihemoglobina, la inhibición desaparece. La oxihemoglobina es una proteína que al añadirla al baño permanece en el compartimento extracelular y sólo interacciona con el NO a nivel extracelular. Por tanto, estos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos con la detección electroquímica del NO y confirman la idea

que sugiere que el SNP libera el NO a nivel intracelular y que en el caso del SNAP, parte del NO es liberado en el medio extracelular aunque la mayoría se libera preferentemente a nivel intracelular.

**Estrés oxidativo.** Los resultados discutidos anteriormente indican que en las arterias pulmonares de lechón, la NAD(P)H oxidasa de la adventicia genera el  $O_2^-$  capaz de inactivar el NO. Por tanto, el NO exógeno puede inducir relajación de las células musculares lisas, siempre y cuando logre rebasar la *barrera química* de la adventicia. Con la utilización de fármacos que liberan NO a nivel intracelular se podría evitar la barrera de la adventicia y asegurar su efecto vasodilatador. A diferencia de los resultados obtenidos con el NO, el efecto relajante del SNAP no se modificó por la SOD exógena, el  $MnCl_2$  o por el sistema generador del  $O_2^-$  XO/HX y sólo fue inhibido, débilmente, por el DETCA. Sin embargo, ninguno de estos agentes modificó la relajación inducida por el SNP. Es decir, el efecto relajante inducido por los donadores de NO se ve afectado levemente o no se afecta por el  $O_2^-$  endógeno, incluso cuando éste se incrementa al inhibir la SOD o al ser añadido exógenamente. De nuevo, estos datos concuerdan con los obtenidos con el electrodo y con la oxihemoglobina.

Tomando en su conjunto todos los resultados del presente trabajo, proponemos que el estrés oxidativo modula de forma distinta la acción vasodilatadora del NO gaseoso, del SNAP y del SNP y que estos donadores liberan NO a un compartimento diferente a la fuente endógena de producción del  $O_2^-$  (es decir, la adventicia). Dicho compartimento de liberación de NO estaría localizado en o cerca del sitio de acción del NO y, por tanto, no es fácilmente accesible al  $O_2^-$  endógeno (por ejemplo la célula muscular lisa).

## IMPLICACIONES

Desde el punto de vista anatómico, la barrera adventicial no tiene una clara significación fisiológica para el NO, puesto que el endotelio es la prin-



principal fuente fisiológica de NO endógeno y desde donde éste difunde hacia las células musculares lisas adyacentes. Sin embargo, el NOi empleado en terapéutica tiene que cruzar la adventicia en su camino desde el alvéolo hacia las células musculares lisas de la arteria pulmonar. Por lo tanto, aun cuando la adventicia es una capa muy delgada en arterias de resistencia pulmonar, el NOi podría ser inactivado por el estrés oxidativo a este nivel.

En condiciones fisiológicas, la inactivación del NO por el  $O_2^-$  y la correspondiente producción de  $ONOO^-$  esta limitada por la actividad de la SOD intracelular. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de NO (por ejemplo, tras la administración de NOi) o en situaciones patológicas (por ejemplo, hipertensión pulmonar asociada a sepsis, síndrome de distrés respiratorio, o de otras formas de daño pulmonar) puede producirse un aumento del estrés oxidativo y, en consecuencia, una elevación de los niveles de  $ONOO^-$ . Éste es un producto tóxico a nivel pulmonar (Hampl y Herget, 2000), por lo que el efecto beneficioso del NOi podría verse atenuado parcialmente por el daño pulmonar inducido por el  $ONOO^-$ . Por lo anterior, es importante que se evite en la medida de lo posible la formación de  $ONOO^-$  durante la terapia del NOi.

El uso de donadores de NO administrados de forma inhalada, que son menos susceptibles a la inactivación por el  $O_2^-$ , podría ser una estrategia más efectiva para liberar NO en las CMLV, evitando la inactivación por el  $O_2^-$  y la formación excesiva de  $ONOO^-$ . De hecho, resultados preliminares indican que la administración de SOD por vía intravenosa asociada a la terapia con NOi puede ser beneficiosa (Albert y cols., 1999). Una teórica ventaja adicional es que la baja inactivación de los donadores de NO por la oxihemoglobina conllevaría un menor riesgo de metahemoglobinemia. Sin embargo, puesto que la inactivación del NO por oxihemoglobina determina la selectividad pulmonar (debido a la rápida eliminación del NO por la sangre), este beneficio podría conseguirse a costa de un incremento de sus efectos sistémicos (Green y cols., 1982). Recientemente, se han descrito estudios experimentales y clínicos acerca de la utilización de los donadores de NO administrados

por vía inhalatoria, principalmente con SNP que sugieren que estos fármacos podrían producir un efecto selectivo al nivel pulmonar.

## VI. CONCLUSIONES

1. En las arterias pulmonares de lechones de 1 y 15 días de edad, el estrés oxidativo basal o el estimulado exógenamente, modula la acción vasodilatadora del NO. Nuestros resultados demuestran que la NAD(P)H oxidasa de la adventicia es la principal fuente endógena del anión superóxido.
2. La vasodilatación inducida por el NO de origen endotelial y por el NO exógeno aumenta con la edad postnatal. La actividad de la NAD(P)H oxidasa y de la PDE-V modula la respuesta al NO de manera similar en ambas edades. Sin embargo, este aumento de la respuesta al NO desaparece en presencia de indometacina, meclofenamato y aspirina, sugiriendo la implicación de un aumento en la actividad de la ciclooxigenasa-1 en los primeros momentos de vida postnatal.
3. El NO y los donadores de NO, SNAP y SNP, comparten el mismo mecanismo de acción vasodilatadora, pero presentan diferencias en la cinética y distribución regional de la liberación del NO, que influyen de manera importante no sólo en la potencia y duración del efecto relajante, sino también en la susceptibilidad para que este efecto sea inhibido por el anión superóxido y por la oxihemoglobina.
4. Salvando las limitaciones que todo estudio *in vitro* presenta, el hallazgo de que el SNAP y el SNP sufren una menor inactivación

por el anión superóxido que la que se observa con el NO gaseoso, sugiere que la administración de estos fármacos por vía inhalatoria, o la asociación de NOi con superóxido dismutasa o sus miméticos, podrían ser estrategias terapéuticas alternativas en la hipertensión pulmonar persistente neonatal para producir vasodilatación pulmonar menos dependientes del *status* oxidativo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABMAN S., CHATFIELD B., HALL S. Y MCMURTRY I. (1990) *Am. J. Physiol.* 259: H1921-H1927.
- (2) ABMAN S., CHATFIELD B., RODMAN D., HALL S. Y MCMURTRY I. (1991) *Am. J. Physiol.* 260: L280-L285.
- (3) ALBERT G., DAVIS J., ROBBINS C. Y STEINHORN R. (1999) *Pediatr. Res.* 45: 293A.
- (4) AZUMI H., INOUE N., TAKESHITA S., RIKITAKE Y., KAWASHIMA S., HAYASHI Y., ITOH H. Y YOKOYAMA M. (1999) *Circulation* 100:1494-1498.
- (5) COGOLLUDO A. (1999) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- (6) COGOLLUDO A., PÉREZ-VIZCAÍNO F., ZARAGOZÁ-ARNÁEZ F., IBARRA M., LÓPEZ-LÓPEZ G., LÓPEZ-MIRANDA V. Y TAMARGO J. (2001) *Br. J. Pharmacol.* 132: 959-967.
- (7) FINEMAN J., SOIFER S. Y HEYMANN M. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* 57: 115-134.
- (8) FINNER N. Y BARRINGTON K. The Cochrane Library. (2000) Oxford: Update Software. Issue 1.
- (9) FURCHGOTT R. *Mechanism of Vasodilatation.* (1988) Ed: Vanhoutte P., Raven Press, New York. 1988: 31-36.
- (10) FURCHGOTT R. Y ZAWADZKI J. (1980) *Nature* 288:373-376.
- (11) GERSONY W., DUC G. Y SINCLAIR J. (1969) *Circulation* 1969; 30: 87-94.
- (12) IGNARRO L., BUGA G., WOOD K., BYRNES R. Y CHAUDHURI G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9265-9269.

- (13) KARAKI H., OZAKI M., HORI M., MITSUI-SAITO K., AMANO K., HARADA, S. MIYAMOTO, H. NAKAZAWA K., WON K. Y SATO K. (1997) *Pharm. Rev.* 49:157-230.
- (14) LIU S., HISLOP A., HAWORTH S. Y BARNES P. (1992) *Br. J. Pharmacol.* 106: 324-330.
- (15) MORECROFT I. Y MCLEAN M. (1998) *Br. J. Pharmacol.* 125: 1585-1593.
- (16) MORIN F. Y STENMARK K. (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 151: 2010-2032.
- (17) PALMER R. Y MONCADA S. (1989) *Biochem. Biophys. Res.* 158: 348-352.
- (18) PÉREZ-VIZCAÍNO F., VILLAMOR E., DUARTE J. Y TAMARGO J. (1997) *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121: 1323-1333.
- (19) SÁNCHEZ-LUNA M., ELORZA M., ÁLVAREZ I., PÉREZ-RODRÍGUEZ J. Y QUERO J. (1993) En: *Physiologic Basis of Perinatal Care*. Eds: Medina J. y Quero J., Ergon. 395-398.
- (20) SIES H. (1999) *Oxidative stress and vascular disease*. Ed: Keaney J., Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-8.
- (21) STEINHORN R., RUSSEL J., LAKSHMINRUSIMHA S., GUGINO S., BLACK S. Y FINEMAN J. (2001) *Am J Physiol.* 280: H311-H317.
- (22) THANNICKAL V. Y FANBURG B. (2000) *Am. J. Physiol.* 279: L1005-L1028.
- (23) TOUYZ R. (2000) *Curr. Hypertens. Rep.* 2000; 2: 98-105.
- (24) TSENG CH., TABRIZI-FARD M. Y FUNG H. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 737-742.
- (25) WANG H., PAGANO J., DU Y., CAYATTE J., QUINN T., BRECHER P. Y COHEN A. (1998) *Circ Res.* 82: 810-818.
- (26) WOODRUM, D., BROPHY, C., WINGARD, C., BEALL, A. Y RASMUSSEN, H. (1999) *Am. J. Physiol.* 277: H931-H939.

