

UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



TESIS DOCTORAL

**Papel de los P2-purinorreceptores en la función cardiovascular renal en diferentes situaciones fisiopatológicas.**

OSCAR FERNANDEZ MARTIN  
GRANADA 2008



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 HISTORIA DE LOS PURINORRECEPTORES .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 CLASIFICACION DE LOS PURINORRECEPTORES.....</b>	<b>8</b>
<b>1. 2.1 Subclases del purinorreceptor Adenosina/P1.....</b>	<b>8</b>
<b>1. 2.2 Subclases del purinorreceptor ATP/P2.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 MEDIADORES RESPONSABLES DE LA RESPUESTA PURINÉRGICA.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1 Acciones vasculares de los agonistas P2 en animales y humanos.....</b>	<b>12</b>
1.3.1.1 Vasos aislados.....	12
1.3.1.2 Lechos vasculares.....	12
1.3.1.3 Animales intactos y humanos.....	13
<b>1.3.2 Purinorreceptores P2x:mediadores de vasoconstricción de los vasos de las fibra musculares lisas.....</b>	<b>14</b>
1.3.2.1 Purinorreceptores P2x y cotransmisión simpática.....	14
1.3.2.2 Purinorreceptores P2x y transmisión no simpática.....	15
<b>1.3.3 Purinorreceptores P2y:mediadores de vasodilatación de los vasos de las fibras musculares lisas.....</b>	<b>15</b>
1.3.3.1 Purinorreceptores P2y y cotransmisión simpática.....	15
1.3.3.2 Purinorreceptores P2y y transmisión no simpática.....	15
<b>1.3.4 Vasodilatación mediada por purinorreceptores P2y vía endotelial.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.5 Contribución de los derivados del citocromo P450 al control del tono vascular.....</b>	<b>22</b>
1.3.5.1 El citocromo P450.....	22
1.3.5.2 Metabolitos fundamentales a nivel vascular.....	22
1.3.5.3 Tono vascular.....	23
1.3.5.3.1 EETs.....	23
1.3.5.3.2 20-HETE.....	25
1.3.5.3.3 Otras funciones vasculares.....	26
<b>1.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS A DISFUNCIÓN PURINÉRGICA.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1 Diabetes.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.2 Cáncer.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.3 Fibrosis quística.....</b>	<b>27</b>

<b>1.4.4 Hipertensión pulmonar.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.5 Surfactante y secreción de mucina.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.6 Fallo renal/ Insuficiencia renal.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.7 Otras patologías y circunstancias.....</b>	<b>28</b>
1.4.7.1 En huesos y cartílagos.....	28
1.4.7.2 En incontinencia urinaria.....	28
1.4.7.3 En trombosis.....	29
1.4.7.4 En taquicardia ventricular.....	29
1.4.7.5 En tracto gastrointestinal.....	29
1.4.7.6 En Sistema Nervioso Central.....	29
1.4.7.7 En reproducción humana.....	29
1.4.7.8 En ojos.....	29
1.4.7.9 En oído.....	30
1.4.7.10 En órganos nasales.....	30
<b>1.5 ALTERACIONES DE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN DIFERENTES SITUACIONES FISIOPATOLÓGICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5.1 Reactividad vascular en el fenómeno de isquemia reperfusión.....</b>	<b>30</b>
1.5.1.1 Respuesta a vasoconstrictores.....	31
1.5.1.2 Respuesta a vasodilatadores.....	32
<b>1.5.2 Reactividad vascular y diferencias de género.....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.3 Reactividad vascular en la hipertensión espontánea.....</b>	<b>35</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES RELAJANTES DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS P2y.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 REACTIVIDAD RENAL VASCULAR A LOS P2 PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).....</b>	<b>38</b>
<b>2.3 REACTIVIDAD VASCULAR EN EL FENÓMENO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4 CYP P450 Y REACTIVIDAD VASCULAR.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5 DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LA REACTIVIDAD VASCULAR.....</b>	<b>40</b>

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES RELAJANTES RELAJANTES DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVIDAD DE LOS P2y PURINORRECEPTORES.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 REACTIVIDAD VASCULAR RENAL A LOS P2 PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA TRAS EL FENÓMENO DE ISQUEMIA- REPERFUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4 PAPEL DE LOS DERIVADOS DEL CYP 450 EN LA REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 REACTIVIDAD VASCULAR Y DIFERENCIAS DE GÉNERO.....</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 ANIMALES.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 PREPARACION DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.1 Protocolo experimental nº1: Reactividad vascular renal purinérgica en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.2 Protocolo experimental nº2: Cotribución de los factores relajantes del endotelio a la vasodilatación inducida por la activación de los purinorreceptores P2y.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3 Protocolo experimental nº3: isquemia-reperfusión y reactividad vascular renal purinérgica.....</b>	<b>47</b>
4.3.3.1 Experimento nº1.....	47
4.3.3.2 Experimento nº2.....	48
<b>4.3.4 Protocolo experimental nº4: Papel de los derivados del citocromo P450 en la reactividad vascular renal purinérgica.....</b>	<b>48</b>
4.3.4.1 Experimento nº1.....	48

4.3.4.2 Experimento nº2.....	48
<b>4.3.5 Protocolo experimental nº5: Reactividad vascular renal purinérgica y diferencias de género.....</b>	<b>49</b>
4.3.5.1 Experimento nº1.....	49
4.3.5.2 Experimento nº2.....	49
<b>4.4 DROGAS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 TABLAS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 GRÁFICAS Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.1 Resultados sobre mediadores endoteliales de la respuesta purinérgica.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.2 Resultados sobre la contribución purinérgica en la hipertensión espontánea en ratas.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.3 Resultados sobre reactividad vascular renal purinérgica tras un proceso de isquemia-reperusión.....</b>	<b>67</b>
5.2.3.1 Respuesta a vasoconstrictores.....	67
5.2.3.2 Respuesta a vasodilatadores.....	70
<b>5.2.4 Resultado sobre el papel de los derivados de citocromo P450 en la reactividad vascular renal purinérgica.....</b>	<b>72</b>
5.2.4.1 Respuesta a vasoconstrictores.....	72
5.2.4.2 Respuesta a vasodilatadores.....	73
<b>5.2.5 Resultados sobre diferencia en la respuesta purinérgica en función del género.....</b>	<b>73</b>
5.2.5.1 Respuesta a vasoconstrictores.....	73
5.2.5.2 Respuesta a vasodilatadores.....	73
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1 CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES VASODILATADORES DERIVADOS DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LOS P2y PURINORRECEPTORES EN EL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO DE LA RATA.....</b>	<b>77</b>

---

<b>6.2 LA REACTIVIDAD RENAL VASCULAR MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS P2-PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.....</b>	<b>79</b>
<b>6.3 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA.....</b>	<b>80</b>
<b>6.3.1 Reactividad P2x purinérgica en isquemia-reperfusión.....</b>	<b>80</b>
<b>6.3.2 Reactividad P2y purinérgica en isquemia-reperfusión.....</b>	<b>82</b>
<b>6.4 PAPEL DE LOS DERIVADOS DEL CYP-450 EN LA ACCIÓN DE LOS AGONISTAS PURINÉRGICOS EN LA VASCULATURA RENAL.....</b>	<b>83</b>
<b>6.5 REACTIVIDAD P2-PURINÉRGICA EN MACHOS Y HEMBRAS.....</b>	<b>84</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>88</b>

## Lista de abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

Ach: Acetilcolina

ADP: Adenosín-difosfato.

AngII: Angiotensina II

AMP: Adenosín-monofosfato

AMPc: Adenosin-monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín-trifosfato.

BK: Bradiquinina

Ca<sup>2+</sup>: Calcio.

Cl<sub>2</sub>Ba: Cloruro de bario.

COX: Ciclooxigenasa

CMLV: Células músculo liso vascular.

CYP: Citocromo p450.

EDHF/FHDE: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EDRF: Factor relajante derivado del endotelio.

EET<sub>5</sub>: Ácidos epoxieicosatrienoicos.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HETEs: Ácidos hidroxieicosatetraenoicos.

HT-5: Serotonina

K<sup>+</sup>: Potasio.

Kcl: Cloruro de potasio

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

L-NAME: L<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster.

L-NOARG: L-nitroarginina.

Na<sup>+</sup>: Sodio

NA: Noradrenalina

NE : Norepinefrina

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa

NP : Nitroprusiato

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

ODYA: Ácido 17-octadecinoico.

PA: Presión arterial

PAM: Presión arterial media



PAS: Presión arterial sistólica.  
PCS: Prostaciclina sintasa  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina.  
PG<sub>s</sub>: Prostaglandinas  
Phe : Fenilefrina  
PKc: ProteínKinasa C.  
PL: Fosfolípidos  
PLC: Fosfolipasa C.  
PPR: Presión perfusión renal.  
PRA: Actividad plasmática renina.  
RVR: Resistencias vasculares renales.  
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas.  
SNC: Sistema nervioso central.  
TEA: Tetraetilamonio  
T<sub>x</sub>A<sub>2</sub> : Tromboxano A<sub>2</sub>.  
UTP: Uridín-5-trifosfato.  
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad  
WKY: Ratas Wistar-Kyoto.

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 HISTORIA DE LOS PURINORRECEPTORES

Las potentes acciones extracelulares de los nucleósidos y nucleótidos de las purinas, llamados adenosina y ATP se reconocieron por primera vez por Drury y Stent-Gyorgyi (1929), que definieron el importante papel de los compuestos de adenina en el corazón de los mamíferos. Siguiendo esta línea de trabajo en el año 1933 Gillispie y en 1950 Green y Stoener, descubrieron que la adenosina y el ATP tenían actividad en el sistema cardiovascular.

Las potentes acciones vasodilatadoras de los compuestos de adenina fueron definidas por Holton y Holton (1954) y propusieron que el ATP era una sustancia vasodilatadora que aumenta con la estimulación de los nervios sensitivos de las arterias del oído del conejo, una hipótesis que más tarde se demostró mediante la estimulación del gran nervio auricular (Holton, 1959).

La sensibilidad de la red vascular coronaria a estos mismos compuestos indujo a Berne en 1963 a proponer que la adenosina era el mediador fisiológico en la vasodilatación coronaria asociada con la hipoxia miocárdica, lo que apoyó el papel del ATP y de la adenosina como reguladores de procesos fisiológicos. En el mismo periodo, en la década de los 60, se descubrió un componente en el sistema nervioso autónomo que no era adrenérgico ni colinérgico. Este componente estaba presente de forma importante en el tracto gastro-intestinal y posteriormente fue identificado en varios órganos como pulmón, vejiga urinaria, vesículas seminales, esófago, útero, ojos, traquea y algunas partes del sistema cardiovascular.

Usando el criterio de Eccles (1964), para la aceptación de los neurotransmisores, en la década de los 70 Burnstock propuso que la principal sustancia que aumentaba en estas terminaciones nerviosas era el ATP y como consecuencia esos nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos pasaron a denominarse nervios purinérgicos (Burnstock et al, 1970; Burnstock, 1972).

En los años siguientes, la teoría purinérgica fue consolidándose por un gran número de evidencias experimentales que apoyaban el papel del ATP como transmisor y co-transmisor con Na, Ach y otras sustancias (Burnstock, 1976; Burnstock, 1990), y que dieron lugar a la identificación de los receptores específicos extracelulares que median la gran variedad de efectos fisiológicos inducidos por las purinas.

En 1978, Burnstock, a través de una revisión basada en el análisis de la literatura sobre las acciones de las purinas en un gran número de tejidos, propuso la base para distinguir dos tipos de receptores purinérgicos, denominados purinorreceptores P1 y P2, activados de forma preferente por Adenosina y ATP respectivamente. Esta clasificación se basó en 4 criterios:

1. La potencia relativa de ATP; ADP; AMP y adenosina.

2. Las acciones selectivas de los antagonistas particularmente metilxantinas, las cuales compiten antagónicamente con la adenosina pero no con las acciones del ATP.
3. La modulación de la adenilciclase inducida por la adenosina pero no por el ATP.
4. La inducción de la síntesis de prostaglandinas por ATP pero no por adenosina.

Dicha clasificación ha sido adoptada por la IUPHAR Subcomité for Purinoceptors Subclassification (Abracchio et al, 1993; Fredholm et al, 1994).

En el año 1985 se llega a la clasificación de los receptores P2 en P2x y P2y (Burnstock y Kennedy, 1985) y posteriormente, en los años 1994-1996, se localizan los siete subtipos de P2x al ser clonados.

Todos estos hallazgos han supuesto un amplio conocimiento sobre los purinorreceptores P2, lo que ha dado lugar a una línea de investigación de fármacos con posibles aplicaciones futuras en el ser humano.

## 1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS PURINORRECEPTORES

### 1.2.1 Subclases del purinorreceptor Adenosina/P1

Como consecuencia de los trabajos de Londos et al, 1980 y del grupo de Hamprecht (Van Calker et al, 1979) se logró la identificación de dos subclases de receptores de adenosina que originalmente fueron definidos dependiendo de si su activación inhibía o estimulaba la actividad de la adenilciclase. Estos dos receptores se denominaron A1 y A2 por Van Calker et al., nomenclatura que se usó con posterioridad en la literatura (Abbracchio et al, 1993).

Más recientemente Zhou et al y Cornfield et al, en 1992, identificaron los subtipos A3 y A4 por clonación.

### 1.2.2 Subclases del purinorreceptor ATP/P2

En 1985, Burnstock y Kennedy subclasificaron los receptores P2 en dos subtipos: P2x y P2y. Esta clasificación se basó en la respuesta funcional a análogos o a antagonistas selectivos del ATP en diferentes sistemas biológicos. Así para los purinorreceptores P2x los análogos del ATP en orden de potencia son:  $\alpha,\beta$ -metilénATP  $\geq$   $\beta,\lambda$ -metilén ATP > ATP  $\approx$  2 metiltioATP = ADP, y el antagonista selectivo es el ANA pp3. Para los purinorreceptores P2y: 2 metil S ATP > ATP >>  $\alpha,\beta$ -metilénATP =  $\beta,\lambda$ -metilén ATP, y como antagonistas selectivos se utilizaron: reactivo Blue 2, antraquinona, ácido sulfónico.

Otra clasificación se basa en que los purinorreceptores P2 se encuentran acoplados a diferentes mecanismos de transducción.

Así los P2x son canales iónicos permeables al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y los purinorreceptores P2y están acoplados a proteínas G, lo que activa sistemas enzimáticos selectivos que regulan las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros (Gilman, 1987). En el caso de los purinorreceptores P2y los efectos sistémicos están mediados por la fosfolipasa C y la fosfolipasa A2 con la consiguiente producción de metabolitos del ácido araquidónico) o por la Adenil Ciclasa que modula los niveles de AMPc (Fredholm et al., 1994).

**Tabla clasificatoria de los purinorreceptores**

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transducción
<b>P1 (adenosina)</b>				
A <sub>1</sub>	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón y terminales nerviosas autonómicas	CCPA, CPA	DPCPX, N0840, MRS1754	G <sub>i1</sub> , G <sub>i2</sub> and G <sub>i3</sub> , ↓cAMP
A <sub>2A</sub>	Cerebro, corazón, pulmones.	CGS21680	KF17837, SCH58261	G <sub>s</sub> , ↑cAMP
A <sub>2B</sub>	Intestino grueso, vejiga	NECA (no selectivo)	Enprofylline, MRE2029F20	G <sub>s</sub> , ↑cAMP
A <sub>3</sub>	Pulmón, hígado, cerebro, testículos, corazón.	IB-MECA, Cl-IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L268605, MRS1191	G <sub>i2</sub> , G <sub>i3</sub> and G <sub>q/11</sub> , ↓cAMP, ↑Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>
<b>P2X</b>				
P2X <sub>1</sub>	Músculo liso, plaquetas, cerebelo y neuronas del cuerno espinal dorsal.	$\alpha, \beta$ -metilénATP = ATP = 2-meSATP (desensibilización rápida).	TNP-ATP, IP <sub>5</sub> I, NF023, NF449	Cationes canal intrínseco (Ca <sup>2+</sup> y Na <sup>+</sup> )
P2X <sub>2</sub>	Músculo liso, SNC, retina, células	ATP ≥ ATP $\gamma$ S ≥ 2-meSATP $\gg$ $\alpha, \beta$ -	Suramina, isoPPADS,	Ión del canal intrínseco

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transducción
	cromafines, ganglios autonómicos y sensoriales.	metilénATP (pH y zinc sensitivo)	RB2, NF770	(fundamentalmente $Ca^{2+}$ )
P2X <sub>3</sub>	Neuronas sensoriales, NTS, algunas neuronas simpáticas.	2-MeSATP $\geq$ ATP $\geq$ $\alpha,\beta$ -metilénATP $\geq$ Ap <sub>4</sub> A (desensibilización rápida)	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110	Canal intrínseco catiónico
P2X <sub>4</sub>	SNC, testículos, colon.	ATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -metilénATP, CTP, ivermectin	TNP-ATP (weak), BBG (weak)	Canal intrínseco iónico (fundamentalmente $Ca^{2+}$ )
P2X <sub>5</sub>	Células proliferativas de la piel, intestino, vejiga, timo, medula espinal	ATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -metilénATP, ATP $\gamma$ S	Suramina, PPADS, BBG	Canal intrínseco iónico
P2X <sub>6</sub>	SNC, neuronas motoras de la medula espinal	-	-	Canales iónicos intrínsecos.
P2X <sub>7</sub>	Células apoptóticas como por ejemplo las células inmunes, páncreas y piel.	BzATP > ATP $\geq$ 2-meSATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -metilénATP	KN62, KN04, MRS2427,	Canal intrínseco catiónico y un largo poro con activación prolongada.

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transducción
<i>P2Y</i>				
P2Y <sub>1</sub>	Células epiteliales y endoteliales, plaquetas, células inmunológicas y osteoclastos.	2-MeSADP > 2-meSATP = ADP > ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; PLC-β activación
P2Y <sub>2</sub>	Células inmunes, células epiteliales y endoteliales, túbulos renales y osteoblastos.	UTP = ATP, UTPγS, INS37217	Suramina > RB2, ARC126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> y posiblemente G <sub>i</sub> ; activación PLC-β
P2Y <sub>4</sub>	Células endoteliales	UTP ≥ ATP, UTPγS	RB2 > suramina	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> y posiblemente la activación G <sub>i</sub> ; PLC-β .
P2Y <sub>6</sub>	Algunas células epiteliales, placenta, células T y timo.	UDP > UTP ≫ ATP, UDPβS	MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; activación PLC-β .
P2Y <sub>11</sub>	Bazo, intestino, granulocitos.	ARC67085 > BzATP ≥ ATPγS > ATP	Suramina > RB2, NF157	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> and G <sub>s</sub> ; activación PLC-β .
P2Y <sub>12</sub>	Plaquetas y células gliales.	2-MeSADP ≥ ADP ≫ ATP	CT50547, ARC69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413	G <sub>i</sub> (G <sub>o</sub> ); inhibición de la adenilciclasa.
P2Y <sub>13</sub>	Bazo, cerebro, nódulos linfoides , medula ósea.	ADP = 2- meSADP ≫ ATP y 2- meSATP	MRS2211	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>
P2Y <sub>14</sub>	Placenta, tejido	UDP glucosa =	–	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transducción
	adiposo, estómago, intestino y algunas regiones cerebrales.	UDP-galactosa		

### 1.3 MEDIADORES RESPONSABLES DE LA RESPUESTA PURINÉRGICA

#### 1.3.1 Acciones vasculares de los agonistas P2 en animales y humanos.

##### 1.3.1.1 Vasos aislados

En los vasos aislados, la respuesta al ATP depende del flujo vascular:

**A bajo flujo:** la respuesta vascular al ATP es predominantemente vasoconstrictora en la fibra muscular lisa y está mediada por los purinorreceptores P2x.

**A flujo elevado:** la respuesta vascular al ATP es predominantemente vasodilatadora y está mediada por los purinorreceptores P2y de las células endoteliales.

La integridad estructural y funcional del endotelio es crucial para la respuesta vascular. De esta forma situaciones fisiopatológicas como la arteriosclerosis y la edad pueden reducir la contribución vasodilatadora de los purinorreceptores P2y.

##### 1.3.1.2 Lechos vasculares

El ATP y el ADP son potentes vasodilatadores y en algunos casos, constrictores de un gran número de lechos vasculares: cerebro, coronarias, renal, cuartos traseros, cuartos superiores (Haddy y Scout, 1968). Las potentes funciones vasodilatadoras del ATP y del ADP en la mayoría de los lechos vasculares se han explicado a través de la regulación del flujo sanguíneo.

En el lecho vascular coronario de la rata las respuestas al ATP pueden producir vasoconstricción y vasodilatación, una respuesta bifásica que está mediada por los purinorreceptores P2x y P2y respectivamente. En 1976 un estudio de Paddle y Burnstock muestra que el ATP aumenta durante la hipoxia cardiaca y que juega un papel determinante junto con la adenosina en la modulación fisiológica del flujo coronario.

En 1989 Hopwood et al., demostraron que la hidroquinona, un antagonista del NO, bloqueaba la dilatación producida por 2-metiltilioATP a través de los purinorreceptores P2y y que la vasodilatación mediada por la hipoxia implicaba al ATP y al NO.



El ATP y el ADP causan vasodilatación de los cuartos traseros del gato. ATP y ADP demostraron ser más potentes que la adenosina y el orden de potencia de vasodilatación es: 2-metilatioATP > ADP > ATP >  $\beta,\lambda$ -metilénATP >>  $\alpha,\beta$ -metilén ATP

Es posible que el ATP contribuya a la regulación local del flujo sanguíneo del músculo esquelético durante el ejercicio, ya que se ha demostrado su aumento en las arteriolas de las fibras musculares esqueléticas en estudios *in vitro*.

Se ha demostrado el importante papel de los nucleótidos de purinas en el flujo sanguíneo cerebral (causando vasodilatación o vasoconstricción). El ATP puede verse involucrado por su aumento procedente de células endoteliales como parte de un mecanismo protector de vasodilatación en respuesta a la hipoxia (Burnstock, 1989). En hígado aislado y perfundido del conejo a bajo flujo sanguíneo el ATP y el  $\alpha,\beta$ -metilénATP (expuestos en orden de potencia) provocan vasoconstricción a través de su acción sobre los purinorreceptores P2x.

En preparaciones a flujo sanguíneo aumentado el ATP y el 2-metilatioATP consiguieron vasodilatación a través de los P2y purinorreceptores, pero no el  $\alpha,\beta$ -metilén ATP.

Se ha demostrado la participación de los purinorreceptores P2 en mecanismos vasodilatadores de compensación de la vasculatura hepática arterial en respuesta al flujo sanguíneo bajo en circulación portal.

En la arteria mesentérica de rata, aislada y perfundida, el ATP a bajo flujo sanguíneo provoca vasoconstricción a través de los purinorreceptores P2x, que en orden de potencia con sus análogos es:  $\alpha,\beta$ -metilén ATP > 2metilatioATP > ATP. En las preparaciones a alto flujo provoca vasodilatación a través de purinorreceptores P2y, que en orden de potencia con sus agonistas es: 2metilatioATP > ATP, y donde el  $\alpha,\beta$ -metilén ATP no tiene efecto. Dañando el endotelio, no se produce una reducción de la vasoconstricción mediada por los purinorreceptores P2x pero reducía la respuesta vasodilatadora mediada por P2y, indicando que estos receptores están presentes en la fibra muscular lisa y en las células endoteliales respectivamente, donde contribuyen a la regulación local del flujo sanguíneo mesentérico.

### 1.3.1.3 Animales intactos y humanos

Cuando se infunde o inyecta ATP en animales intactos y humanos, se produce una disminución de la presión sanguínea que se asocia a menudo con bradicardia, del mismo modo, hay un factor de reflejo vagal que se asocia a la administración intraarterial o intravenosa de ATP. En 1979 Forrester et al, describieron que el ATP inyectado en la arteria carótida de los gatos causaba una profunda bajada del flujo sanguíneo cerebral. La importante propiedad vasodilatadora del ATP que provoca hipotensión ha sido investigada para ser utilizada intraoperatoriamente para optimizar las condiciones quirúrgicas. La infusión de ATP también ha sido utilizada para el control de la presión sanguínea en el feocromocitoma (Aso et al., 1986).

Las ventajas de la hipotensión inducida por el ATP es la ausencia de taquifilaxia, estabilidad de presión sanguínea sin repercusión hemodinámica, rápida reversión y ausencia de efecto hipotensor de rebote. Sin embargo algunos autores son reticentes a su uso clínico por la posibilidad de acidosis metabólica y arritmias cardíacas (Boarini et al., 1984).

El ATP produce vasodilatación pulmonar, lo que se ha utilizado para su estudio en enfermedades pulmonares (EPOC) (Gaba et al., 1986). El ATP tiene efectos depresores en el nódulo sinusal y ventricular por lo que se ha utilizado para el tratamiento de varios tipos de taquicardia (Sharma y Klein, 1988).

Resumiendo, podemos decir que los purinorreceptores P2x están localizados en los vasos de la fibra muscular lisa donde provocan una respuesta vasoconstrictora resultado del ATP como cotransmisor con la noradrenalina procedente de nervios simpáticos.

Los purinorreceptores P2y están generalmente localizados en el endotelio vascular donde tienen un papel como mediadores de la vasodilatación vascular por el ATP.

En algunos vasos los purinorreceptores P2y están localizados en la fibra muscular lisa, quizás en asociación con nervios sensoriales purinérgicos, donde pueden provocar vasodilatación por el aumento neuronal de ATP. La acción del ATP y de sus análogos en vasos aislados de lechos vasculares resultará de las acciones mediadas por subtipos de purinorreceptores P2x y P2y, a través de cambios en el tono vascular y en la integridad de los nervios y células endoteliales donde pueden alterar el balance de la respuesta. En algunas situaciones patológicas como la arteriosclerosis hay un importante papel de los purinorreceptores P2 (vasoespasma). El objetivo a seguir es el desarrollo de antagonistas de los purinorreceptores P2x y P2y por su implicación terapéutica en el ser humano.

### **1.3.2 Purinorreceptores P2x: mediadores de vasoconstricción de los vasos de fibras musculares lisas.**

#### **1.3.2.1 Purinorreceptores P2x y cotransmisión simpática**

Los purinorreceptores P2x son los responsables de las respuestas vasoconstrictoras producidas como consecuencia del aumento del ATP en los nervios perivascuales simpáticos. Dichos mecanismos de vasoconstricción a través del P2x se deben a mecanismos biomoleculares en los que están presentes la producción del fosfatidilinositol y la movilización intra y extracelular de  $Ca^{2+}$ . Hay una considerable variación en las proporciones de ATP y noradrenalina usados como cotransmisores en los muchos vasos en los que se ha demostrado el componente purinérgico simpático. Los componentes adrenérgico y purinérgico de la transmisión simpática pueden verse afectados por diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Se ha sugerido que la importancia de los cotransmisores puede variar con la edad. En ratas jóvenes la vasoconstricción es producida en su totalidad por el ATP, no

ocurriendo así en ratas de edad más avanzada. En ratas hipertensas se ha demostrado que el ATP es más importante como mediador de la respuesta en nervios simpáticos (Vidal et al, 1986).

### **1.3.2.2 Purinorreceptores P2x y transmisión no simpática**

La transmisión purinérgica no simpática se ha demostrado en las arterias intrapulmonares de la rata. Se ha descubierto un papel fisiológico vasoconstrictor de los purinorreceptores P2x, dicha acción se ha demostrado en preparaciones de pulmón aislado de la rata (McCormack et al, 1989).

### **1.3.3 Purinorreceptores P2y: mediadores de vasodilatación de los vasos de las fibras musculares lisas.**

#### **1.3.3.1 Purinorreceptores P2y y cotransmisión simpática**

Se han identificado purinorreceptores P2y en las células de las fibras musculares lisas de arterias coronarias del conejo y se ha sugerido que están implicados en la respuesta vasodilatadora al ATP como cotransmisor, conjuntamente con Noradrenalina.

#### **1.3.3.2 Purinorreceptores P2y y transmisión no simpática**

Se han localizado purinorreceptores P2y en las células endoteliales de la vena porta del Conejo (Kennedy y Burnstock, 1985). Hay importantes evidencias que sugieren que los purinorreceptores P2y de las fibras musculares lisas están asociados al ATP procedente de poblaciones de nervios no-simpáticos (Hughes y Vane, 1967). El ATP procedente de nervios colaterales sensitivos de la piel provoca vasodilatación y extravasación plasmática a través de la activación de los purinorreceptores P2y vasculares y a través de ello provoca liberación de histamina procedente de los mastocitos (Kiernan, 1974).

El ATP, a través de los purinorreceptores P2y se ha involucrado en mecanismos como el dolor (Salter y Henry, 1985) y en la activación de los canales iónicos de neuronas sensoriales en ratas (Krishtal et al., 1988).

### **1.3.4 Vasodilatación mediada por purinorreceptores P2y vía endotelial**

En la mayoría de los vasos sanguíneos los purinorreceptores P2y están localizados en las células endoteliales, donde su activación por ATP y ADP provoca vasodilatación (Burnstock y Kennedy, 1986; Burnstock, 1989). En algunos vasos, los purinorreceptores P2y están localizados en los vasos de las fibras musculares lisas. La importancia del endotelio en la vasodilatación vascular fue definida en primer lugar por Furchgott y Zawadzki en 1980, quienes describieron un mediador endotelial de la respuesta vasodilatadora, que denominaron factor

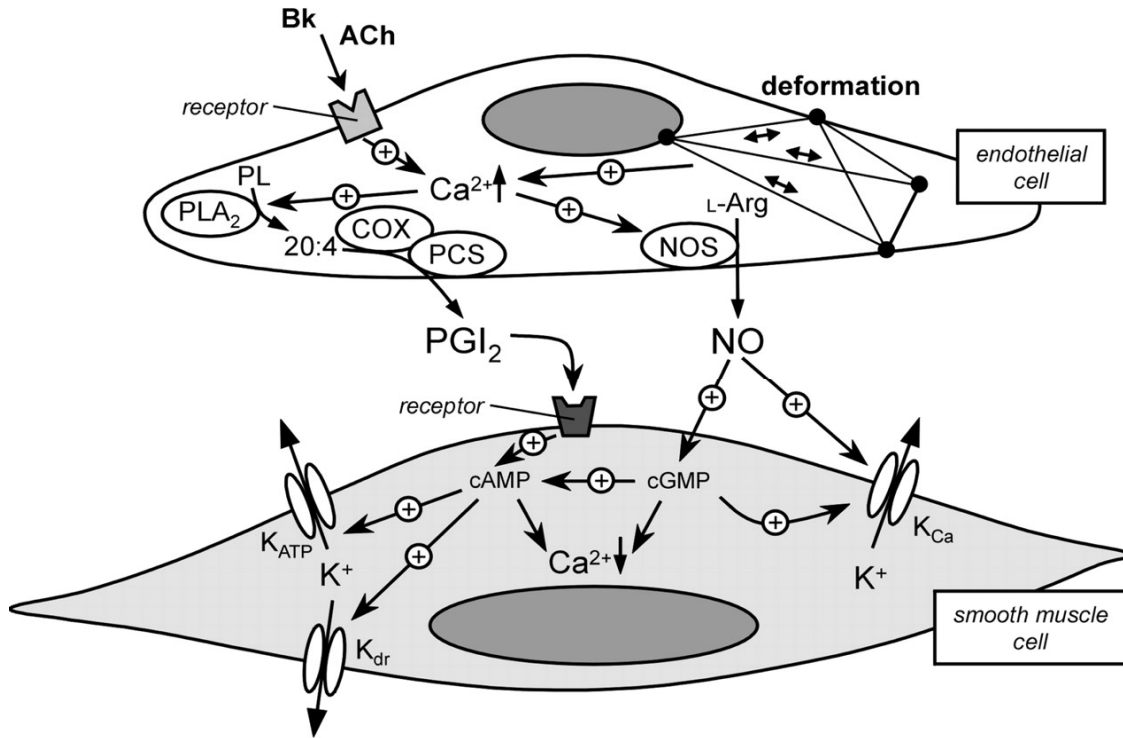
relajante derivado del endotelio (EDRF). Dicho factor fue identificado con posterioridad como el óxido nítrico (NO) (Palmer et al., 1987), que se produce como respuesta a la estimulación de los receptores endoteliales, incluyendo los purinorreceptores P2y que están localizados en células endoteliales y en la superficie de otras células como plaquetas y eritrocitos, por lo que están involucrados en la fisiología y fisiopatología de dichas células. Bajo condiciones normales el aumento de purinas procedentes de estos lugares producirá una vasodilatación mediada por el endotelio a través de los purinorreceptores P2y. En situaciones donde la íntima venosa de la fibra muscular lisa es expuesta al torrente sanguíneo, como en casos de muerte celular endotelial, las purinas pueden actuar a través de los purinorreceptores P2x musculares provocando vasoespasmo y vasoconstricción.

En la arteria mesentérica de la rata, la lesión endotelial con detergente denoxisilato sódico, provoca una abolición de la respuesta vasodilatadora al ATP. Sustancias que inhiben los efectos del NO como es la hemoglobina, azul de metileno e hidroquinona atenúan la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio al ATP y a sus análogos. También se ha demostrado que los derivados de la L-arginina como el L-nitroargininmetiléster (L-NAME) y L-nitroarginina (L-NOARG) son potentes inhibidores de la formación del NO. La L-NOARG ha mostrado su actividad inhibidora de la respuesta al ATP pero no bloquea la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato, independiente del endotelio, en experimentos con órganos de animales aislados y perfundidos.

Los purinorreceptores P2y están también involucrados en la producción de PGI<sub>2</sub>, que contribuye a la vasodilatación vascular (Schwartzman et al., 1981). La fosfolipasa A<sub>2</sub> (la enzima que limita la síntesis de PGI<sub>2</sub>) y la NOS son enzimas calcio-dependientes (Figura 1).

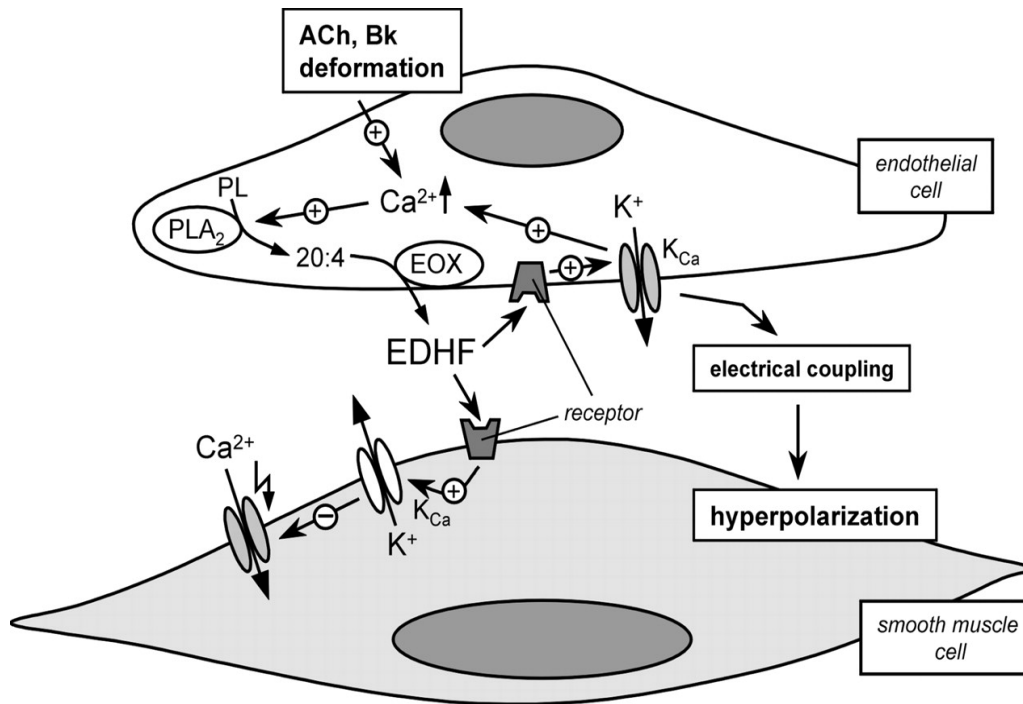
Por otra parte, el endotelio vascular libera un factor difusible que hiperpolariza y por lo tanto relaja el músculo liso vascular, predominantemente a través de la activación de canales de potasio dependientes del calcio. Dicha relajación es bloqueada por la despolarización del músculo liso con una alta concentración de potasio extracelular e inhibidores de los canales de K<sup>+</sup> calcio dependientes como la apamina, caribdotoxina, TEA y en algunos casos la iberiotoxina. La identificación química y la caracterización funcional del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) varían dependiendo del tamaño vascular, del vaso y de las especies. Los tres principales candidatos son los ácidos epoxieicosatrienoicos, el ión potasio y el peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, uniones eléctricas mioendoteliales del tipo gap junctions (comunicantes) sirven para conducir los cambios eléctricos al músculo liso y pueden mediar o propagar la hiperpolarización. En las grandes arterias el EDHF ocupa un papel secundario, mientras que asume un papel más importante en algunas enfermedades como la hipertensión pulmonar y la arterioesclerosis. Sin embargo, en las arteriolas (100-300 micras) el EDHF es el principal determinante del calibre vascular bajo condiciones normales y puede además ser de gran importancia en la regulación de la resistencia vascular. La identificación

química del EDHF permanece sin establecer y podría ser diferente dependiendo del lecho vascular. La pérdida del EDHF contribuye a las complicaciones de la diabetes y de la hipertensión.



**FIGURA 1.** Esquema representativo de las vías que conducen a la formación de NO y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) en las células endoteliales y sus efectos sobre el tono de la fibra muscular lisa. Canales K<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, y K<sub>dr</sub>, Ca<sup>2+</sup>-dependientes, ATP-dependientes, y canales de K<sup>+</sup> retardados, respectivamente; 20:4, ácido araquidónico; Ach, acetilcolina; Bk, bradikinina; COX, ciclooxigenasa; NOS, NO sintasa; PCS, prostaciclina sintasa; PL, fosfolípidos; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; L-Arg, L-arginina.

En cuanto al mecanismo de acción del EDHF se ha descubierto que la relajación (vasodilatación) e hiperpolarización producida por el EDHF está mediada por la apertura de canales de potasio calcio-dependientes en el músculo liso vascular, variando la conductancia dependiendo del vaso estudiado (Figura 2).



**FIGURA 2.** Esquema representativo de las vías que conducen a la formación de factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) en las células endoteliales y sus efectos sobre el tono de la fibra muscular lisa. Canales  $K_{Ca}$ ,  $Ca^{2+}$ -dependientes; 20:4, ácido araquidónico; Ach, acetilcolina; Bk, bradikina; EOX, epoxigenasa; PL, fosfolípidos;  $PLA_2$ , fosfolipasa  $A_2$ .

En cuanto a la significación funcional del EDHF, en estudios con arterias de diferente calibre se ha demostrado que la L-NOARG inhibe la relajación producida por la acetilcolina en la aorta, arteria pulmonar y arterias ilíacas comunes, mientras que más del 80% de la relajación persiste en la mesentérica, femoral y la mayoría de las arterias renales estudiadas. Por el contrario, el componente principal de la relajación por acetilcolina está mediado por un mecanismo independiente del NO (posiblemente por el EDHF) en los vasos periféricos y pequeños vasos. Estudios en arterias mesentéricas de tercer orden de ratas Wistar-Kyoto, con un diámetro de 250-450 micras a 100 mmHg, mostraron que ni la hiperpolarización ni la relajación de la acetilcolina estaban atenuadas por la L-NOARG, por la oxihemoglobina o por la indometacina, indicando que la mayor parte de la relajación y de la hiperpolarización de la acetilcolina permanece en ausencia de producción de NO. El EDHF tiene un mayor papel funcional en la inducción de la relajación por acetilcolina en pequeñas arterias de resistencia.

Recientes experimentos (Campbell y Gauthier, 2002) realizados en arteria coronaria porcina indican que el EDHF puede tener un papel más importante en las grandes arterias de lo que se pensaba. Se encontró que el NO era el principal EDRF en la arteria coronaria porcina, con un mecanismo sensible al potasio que puede reflejar la acción del EDHF, proporcionando un potente suplemento o mecanismo de reserva para la relajación. Este sistema suplementario es capaz de generar entre el 60-80% del total de la relajación tisular si la síntesis de NO era

inhibida. En la arteria coronaria humana el NO y los incrementos en el potencial de membrana operan en paralelo. La liberación basal del EDHF es importante, particularmente en las arterias de resistencia, donde el NO no puede dirigir la relajación dependiente del endotelio. Un trabajo reciente (Hecker, 2000) sugiere que el EDHF juega un papel dominante en el mantenimiento de la presión de perfusión basal en arterias mesentéricas de rata. Esta conclusión está basada en el hecho de que la infusión de L-NAME (un inhibidor de la NO sintasa) incrementa la presión de perfusión basal (contracción del músculo liso), pero solo en una solución con una concentración de  $K^+$  para que la acción del EDHF quede bloqueada. La liberación de EDHF por las células endoteliales, al igual que la producción constitutiva de NO, parece que requiere un incremento en la concentración de calcio intracelular en células endoteliales. El paso de calcio se realizaría a través de canales no selectivos de catión sensibles al níquel (un inhibidor de los mismos). Además, la activación de la proteína G por el NO puede inhibir el influjo de calcio por el canal y bloquear la liberación de EDHF.

El incremento de la presión transmural en segmentos de arteria coronaria incrementa la hiperpolarización medida por el EDHF. En otros experimentos, se ha demostrado que estirando los segmentos se induce un incremento proporcional en la liberación del EDHF, y este efecto era abolido cuando los segmentos habían sido pretratados con 17-ODYA (inhibidor del citocromo P450). Como las arterias coronarias son continuamente deformadas por la contracción rítmica del corazón, la deformación cíclica de las células endoteliales coronarias posiblemente incremente la concentración intracelular de calcio y la liberación de ácido araquidónico dependiente de la fosfolipasa A2, elevando la formación de EDHF y de este modo contribuir a la regulación del flujo sanguíneo coronario.

Por otra parte, las fuerzas mecánicas como el estrés por rozamiento y el flujo pulsante son causantes de vasodilatación, la cual está vinculada con la liberación por el endotelio de factores transferibles. Aunque el NO y la prostaglandina I2 contribuyen a esas dilataciones, estudios recientes indican un papel relevante del EDHF (Garland et al., 1995).

La naturaleza química del EDHF permanece sin esclarecer. Parece ser una molécula menos reactiva que el NO. Esta sugerencia está apoyada por estudios en arterias femorales aisladas de conejo, donde una hipoxantina-xantina oxidasa (un sistema generador de radicales libres) inhibe la relajación producida por la acetilcolina (mediada por el NO), pero no afecta a respuestas equivalentes producidas por el calcimycin (mediado predominantemente por el EDHF). El EDHF aparentemente no es un prostanoides, ya que la hiperpolarización persiste con la presencia de un inhibidor de la ciclooxigenasa (indometacina). Otras sustancias se han propuesto como EDHF en varios vasos, son: los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), peróxido de hidrógeno, ión potasio y endocannabinoides.

Aunque su identidad química no ha sido identificada aún, el EDHF posee una gran importancia clínica.

1) En **arteriosclerosis**: el EDHF es liberado en arterias coronarias humanas aisladas en presencia de L-arginina e indometacina. La relajación dependiente del endotelio en arterias coronarias aisladas de humano se ha demostrado que es bloqueada por la nitro-L-arginina, pero sólo en presencia de un incremento de la concentración de potasio extracelular y de indometacina. Por lo tanto, el NO, el EDHF y los prostanoïdes contribuyen a la relajación en arterias coronarias humanas. Sin embargo, en las arterias coronarias de pacientes con arterioesclerosis severa, la relajación dependiente del endotelio no solo no se afectaba por la enfermedad, sino que además parecía no estar mediada predominantemente por el NO. En estos vasos, el NO, un mecanismo sensible a la concentración de potasio extracelular y un mecanismo mediado por prostanoïdes contribuyen aproximadamente igual a la relajación. Las observaciones clínicas han indicado que la arterioesclerosis está asociada con una disfunción de las células endoteliales. La mayoría de esos estudios usan acetilcolina para provocar la vasodilatación dependiente del endotelio: un pequeño incremento del diámetro en las arterias coronarias era observado normalmente en pacientes sin arterioesclerosis, pero había una disminución del diámetro arterial en pacientes con arterioesclerosis temprana, y este efecto se incrementaba con la progresión de la enfermedad. Sin embargo, se mantenía la vasodilatación provocada por la sustancia P en las arterias coronarias de estos tipos de pacientes. La sustancia P sólo activa receptores taquinina en las células endoteliales, mientras que la acetilcolina activa receptores muscarínicos en el endotelio y músculo liso de la circulación coronaria. Los receptores muscarínicos en el endotelio median la liberación de factores relajantes, mientras que en el músculo liso median la contracción; de modo que la tendencia a la contracción es el resultado del balance entre esos efectos opuestos. Además, la pequeña liberación de factores relajantes posiblemente se debe a la pérdida de células endoteliales y a la acumulación subendotelial de lípidos puede alterar el balance hacia la vasoconstricción. Por otra parte, si las arterias coronarias humanas tienen múltiples EDRFs, la pérdida de uno no afecta a la capacidad global de la arteria para relajarse en respuesta a un estímulo dependiente del endotelio.

2) **Diabetes y resistencia a la insulina**: son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la pérdida de la función del endotelio puede ser un componente crítico de esta patología. Numerosos estudios indican que las respuestas del EDHF están disminuidas en la diabetes. En las arterias mesentéricas, las relajaciones e hiperpolarizaciones producidas por la acetilcolina están atenuadas por la diabetes inducida por estreptozotina. También están disminuidas las relajaciones (hiperpolarizaciones) inducidas por el potasio. En arterias femorales con NO pero sin EDHF no hay diferencia entre diabéticos y sanos. Estos estudios sugieren que la disfunción endotelial asociada a la diabetes se debe a una deficiente respuesta del EDHF, pero no del NO. Otros estudios contradicen este punto de vista indicando una disminución del NO arterial en la hiperglucemia. En un modelo de rata insulín-resistente, la acetilcolina produce relajación de las arterias mesentéricas. El miconazol inhibe las



relajaciones inducidas por la acetilcolina en vasos normales, pero no tiene efecto en vasos de ratas insulín-resistentes, sugiriendo que el EDHF está ausente. Los EETs no relajan las arterias ni abren canales de potasio en células musculares lisas de ratas insulín-resistentes. La presión sanguínea está aumentada en las ratas insulín-resistentes frente a las normales. Por lo tanto, un descenso en la síntesis de metabolitos del citocromo P450 (CYP) o de la actividad de los EETs es un mecanismo que ocasiona daño vascular y eleva la presión sanguínea en la insulín-resistencia.

**3)** En la **hipertensión**, las relajaciones e hiperpolarizaciones inducidas por la acetilcolina se encuentran reducidas en las arterias mesentéricas de ratas espontáneamente hipertensas en comparación con las normotensas. El tratamiento de las ratas hipertensas con un antagonista del receptor de la angiotensina o con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, reduce la presión sanguínea hasta valores normales. Adicionalmente, el tratamiento con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina previene el declive que se produce con la edad en las hiperpolarizaciones inducidas por el EDHF en las arterias mesentéricas de ratas normotensas. Consecuentemente, un beneficio del bloqueo del sistema renina-angiotensina incluye el preservar la función vascular dependiente del EDHF. De modo similar, los incrementos en el flujo sanguíneo producidos por la acetilcolina en el antebrazo, son menores en pacientes hipertensos comparados con sujetos normotensos. La dilatación está debilitada por la inhibición de la NOS en pacientes normotensos, pero no en pacientes hipertensos. En pacientes hipertensos tratados con nifedipino, las dilataciones inducidas por la acetilcolina son similares a las de los sujetos normotensos. Por lo tanto, el bloqueo de canal de calcio preserva la dilatación mediada por el endotelio en la hipertensión.

En conclusión podemos determinar que el EDHF, como el NO y la prostaglandina I<sub>2</sub>, representan un importante papel en la regulación del tono vascular. En los pequeños vasos su actividad no está explicada por una sola identidad química. Los EETs, el peróxido de hidrógeno y el potasio son los candidatos viables para actuar como EDHF. En las pequeñas arterias, las uniones comunicantes pueden mediar o propagar la actividad del EDHF. La importancia fisiológica, farmacológica y patológica del EDHF comienza a ser patente. ¿Es el principal mediador de la dilatación inducida por agonistas y por el flujo sanguíneo?. En la diabetes y la hipertensión, el bloqueo del EDHF contribuye a la pérdida de la función dilatadora y a la disfunción endotelial, mientras que el EDHF puede mantener el flujo sanguíneo miocárdico en enfermedades cardiacas en las que se ha perdido el NO. La mejora del EDHF por medios farmacológicos puede resultar beneficiosa para el tratamiento de estas enfermedades. En algunos vasos, en particular en las arterias coronarias (incluyendo las humanas), este factor manifiesta las características farmacológicas típicas del citocromo P450 y ejerce su efecto activando canales de potasio calcio-dependientes. Como estas células están unidas a través de

uniones eléctricas, la hiperpolarización de solo la primera capa de células musculares lisas por este factor es suficiente para disminuir la tensión de la pared del vaso.

En resumen, la relajación dependiente del endotelio del músculo liso en arterias de resistencia es predominantemente reflejo de la acción de un factor hiperpolarizante diferente al NO, cuya identidad química no es sabida aún. En las grandes arterias, tanto el NO como el EDHF contribuyen a la relajación, siendo la influencia del NO predominante bajo circunstancias normales. La pérdida del NO no compromete el papel funcional de las células endoteliales si la reserva del dilatador dependiente del endotelio es alta y la enfermedad no afecta a la función general de la célula endotelial. Además, dicha reserva tiene un importante papel en el mantenimiento del tono vascular en esas enfermedades, cuestionando la importancia de una pérdida crónica de NO en esta enfermedad.

### **1.3.5 Contribución de los derivados del citocromo P450 al control del tono vascular.**

A partir de experimentos con el citocromo P450 (CYP desde ahora) a nivel renal, surgen hipótesis sobre su capacidad de generación de sustancias a partir del ácido araquidónico, relacionadas con el control homeostático. Existen fuertes evidencias que la activación de distintas enzimas del CYP da lugar a metabolitos involucrados tanto en la vasodilatación independiente del NO y PGI<sub>2</sub>, como en la vasoconstricción por respuesta biogénica. Enzimas como la CYP epoxigenasa o la omega-hidroxilasa, producen metabolitos existentes en las cascadas metabólicas de procesos de proliferación celular a nivel vascular y de angiogénesis.

#### **1.3.5.1 El citocromo P450**

El término citocromo P450 se refiere a una familia singular de hemoproteínas presentes en numerosas especies de seres vivos, que pueden ser consideradas como oxigenasas universales (enzimas que utilizan oxígeno) debido a la variedad de reacciones que catalizan y a los compuestos, estructuralmente diversos, que sirven como sustrato.

Metabolitos generados por la CYP 2J2 como son los ácidos epoxieicoso-cuatrenoicos producen vasodilatación, con distinta potencia según el elemento del que surjan.

La mayoría de las CYP son expresadas originalmente en el hígado. Sin embargo, detectamos estos genes a nivel cardiovascular, gastrointestinal, renal o pulmonar. Recientes estudios detectan estas moléculas en músculo liso vascular y endotelio, donde participarían en la regulación del tono vascular y homeostasis.

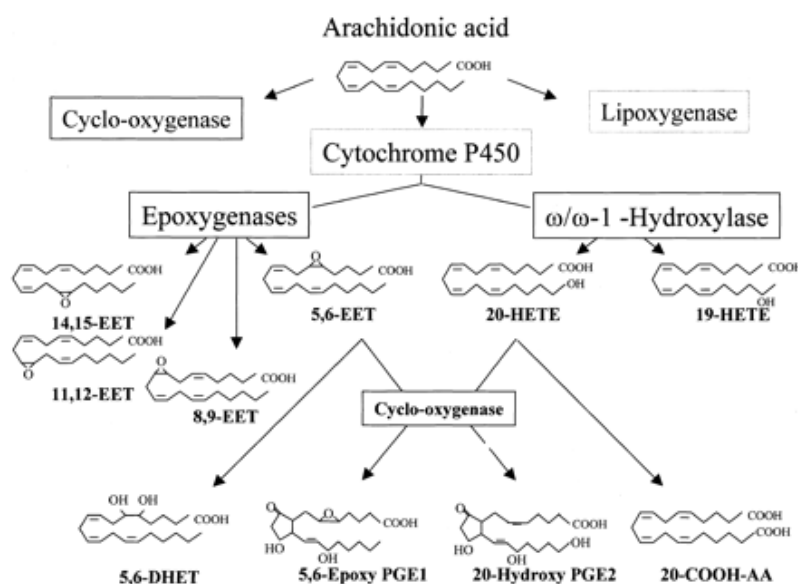
#### **1.3.5.2 Metabolitos fundamentales a nivel vascular**

Los metabolitos generados a partir de la acción de enzimas CYP sobre el ácido araquidónico relacionados con la actividad vascular son los ácidos epoxieicoso-cuatrenoicos

(EETs) generados a través de epoxigenasas y los ácidos hidroxi-eicosa-tetraenoicos (HETEs) formados por la enzima omega/omega-1 hidroxilasa.

Estos metabolitos se localizan en numerosas porciones del sistema cardiovascular, aunque en su mayoría a nivel intracelular, ya que el 90% de los EETs detectados en plasma son esterificados por lipoproteínas como LDL, HDL, VLDL.

Los metabolitos EETs y 20-HETE pueden actuar como moléculas de activación dentro de células vasculares, así como compuestos intermedios en su formación, aunque la respuesta generada puede ser opuesta a la de su progenitor o descendiente.



**Figura 3.** Formación de EET y 20-HETE a partir del ácido araquidónico mediante la vía citocromo P450 monooxigenasa.

### 1.3.5.3 Tono vascular

#### 1.3.5.3.1 EETs

El tono vascular local depende de una gran variedad de factores, como la inervación simpática vasoconstrictora, componentes vasoactivos circulantes, metabolitos tisulares o autacoides derivados del endotelio. El autacoide vasodilatador mejor caracterizado es el NO seguido de la prostaciclina y el EDHF, sustancia liberada por el endotelio que causa la hiperpolarización (y consecuentemente la relajación) del músculo liso vascular.

El EDHF liberado en arterias coronarias y renales en humanos y otras especies presenta características similares a los metabolitos del ácido araquidónico derivados de la acción del CYP, concretamente los EETs generados por epoxigenasas CYP 2C endoteliales. Estas sustancias provocan la hiperpolarización del endotelio y el músculo liso vascular activando

canales de  $K^+$  calcio-dependientes (Campbell et al., 1996) así como bombas de  $Na^+-K^+$  (Pratt et al., 2001).

En los inicios de las investigaciones, las hipótesis sobre el papel de los metabolitos del ácido araquidónico CYP dependientes en las respuestas por EDHF se basaban en el hecho de que los inhibidores de CYP provocaban una marcada disminución de la hiperpolarización independiente de NO/PGI<sub>2</sub> del músculo vascular. Sin embargo, estas conclusiones estaban limitadas por el hecho de que dichos inhibidores no discriminaban entre diferentes isoformas del CYP por lo que no podía inhibir la liberación de EETs circulantes incorporados a fosfolípidos y algunos interferían con la definición de los canales de  $K^+$  como mediadores principales de la función del EDHF (Alvarez et al., 1992). No obstante, algunos inhibidores de epooxigenasas más selectivos han provocado esta respuesta en arteriolas renales, por lo que la teoría se ve sustentada en mayor grado (Imig et al., 2001).

Actualmente, la inhibición farmacológica selectiva de CYP ha potenciado enormemente la teoría de que la activación de CYP es un paso fundamental de la vasodilatación generada por EDHF. Por otro lado, se ha demostrado por técnicas de inmunofluorescencia la existencia de epooxigenasas CYP en endotelio coronario. Además, utilizando la forma apropiada de los inductores de CYP (agonistas de EDHF) como beta-naptoflavona o nifedipino, encontramos que se incrementa la síntesis de EETs en células endoteliales *in vitro* e *in vivo* y se incrementa la hiperpolarización y relajación de segmentos arteriales coronarios (Popp et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999; Fisslthaler et al., 2000). Concretamente, asociamos esta respuesta a cambios más acusados en CYP 2C que en CYP 2J, aunque estos inductores están relacionados con la expresión de un espectro de enzimas muy variado, todos los cuales podrían contribuir a las respuestas mediadas por EET/EDHF.

Existen también pruebas basadas en inhibición no farmacológica que apoyan la teoría: a través de experimentos basados en oligonucleótidos antisentido dirigidos directamente a la región que codifica para CYP 2C8/9. Estos estudios suponen la prueba más convincente de que un metabolito de CYP 2C es un factor permisivo esencial para las respuestas vasculares mediadas por EDHF.

La vascularización renal parece verse modificada especialmente por la actividad del CYP. Aunque los inhibidores clásicos de CYP no producen prácticamente alteración en la sensibilidad vascular (en ausencia de inhibidores de NO sintasa y ciclooxigenasa), en la mayoría de estudios hasta el momento el aumento de la respuesta arteriolar aferente frente a la presión transmural está marcadamente afectado por la inhibición de la CYP epoxigenasa. Los efectos no acaban aquí, ya que a nivel del riñón los EETs también aumentan la excreción de sodio (Maier y Roman, 2001) y disminuyen la excreción cortical de renina (Henrich et al., 1990), además de los efectos moduladores sobre el diámetro vascular.

### 1.3.5.3.2 20-HETE

Los productos de la omega-hidroxiación del ácido araquidónico por el citocromo CYP 4<sup>a</sup> son componentes esenciales de la señal de transducción activada por numerosos sistemas hormonales, como los de la endotelina (Oyekan y McGiff, 1998) y la angiotensina (Croft et al., 2000), que tienen papeles centrales en la regulación de la presión sanguínea (McGiff y Quilley, 1999).

Los datos obtenidos en los últimos años han mostrado una relación entre la generación de 20-HETE y la respuesta biogénica en arterias cerebrales y renales, que es un determinante principal del tono vascular a nivel local. El 20-HETE está producido de forma endógena por las células musculares lisas vasculares tras un incremento de ( $\text{Ca}^{2+}$ ), y una vez formado, aumenta el tono vascular inhibiendo los canales de  $\text{K}^+$  calcio dependientes de alta conductancia, que inducen despolarización y posteriormente un crecimiento en la concentración de calcio. Este aumento de calcio parece relacionado con la activación de los canales  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, aunque los efectos adicionales deben contribuir a la contracción vascular, producida por la activación de una PKC y la inhibición de una Na-K ATPasa (Li et al., 2000).

De esta forma en vasos que expresan CYP 4<sup>a</sup>, la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  mecanodependientes da lugar a la formación de 20-HETE en músculo liso y la consiguiente constricción, lo que apunta a su relación con la autorregulación. Además, podremos afirmar que la respuesta por autorregulación es independiente del endotelio. Aún así, aunque hasta ahora se haya afirmado que el aumento de la presión transmural es el principal estímulo para la producción vascular de 20-HETE, los experimentos realizados en ratas hipertensas (SHR) muestran una relación más importante con la producción de EETs (Pomposiello et al., 2001).

Los factores derivados del endotelio son capaces de modular la respuesta biogénica y al menos una parte de su acción puede ser atribuido a la acción sobre los 20-HETE. El NO llevaría a cabo esta acción modulando la actividad de la expresión del CYP 4. Ciertamente estos mecanismos se han propuesto para explicar la acción natriurética y diurética del NO (Lopez et al., 2001), así como sus efectos relajantes en algunos sistemas arteriales. Por otro lado, los EETs abren los canales de  $\text{K}^+$  calcio dependientes y activan la Na-K ATPasa, realizando una actividad antagonista a los 20-HETE.

Los efectos contrarios del 20-HETE y los EETs sobre el tono vascular se han demostrado de forma convincente a nivel de la vascularización cerebral: la generación de 20-HETE inducida por estímulo mecánico en músculo liso permite este control vascular, y la producción de EETs inducida por astrocitos contrarresta los efectos de los anteriores. Se supone que los EETs formados por esta vía son almacenados en fosfolípidos en los astrocitos, y liberados como respuesta a sinapsis excitatorias (Figura 4).

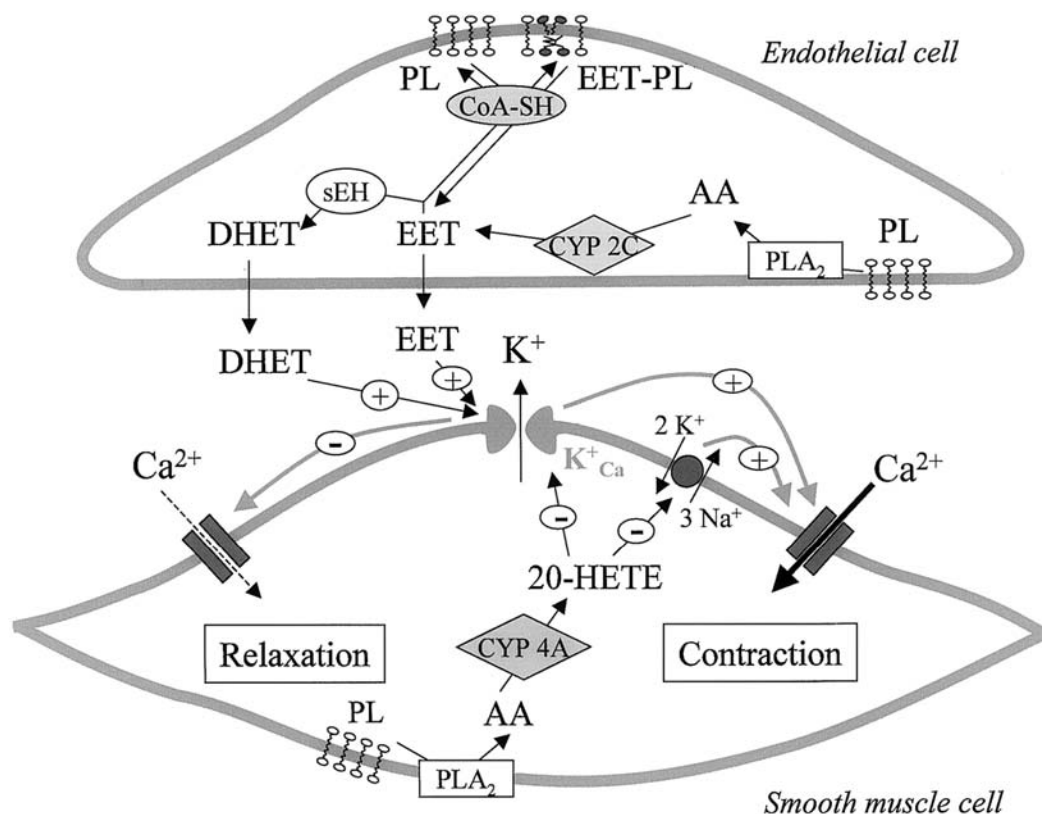


Figura 4. Efectos funcionalmente antagonistas de los EETs y del 20-HETE sobre el tono vascular.

### 1.3.5.3.3 Otras funciones vasculares.

Sabemos que la actividad de los EETs y el 20-HETE no se relacionan únicamente con la activación de los canales de K<sup>+</sup> calcio dependientes, por lo que podemos suponer que los metabolitos derivados del CYP sobre el ácido araquidónico deben ejercer funciones sobre la homeostasis vascular más allá de la vasoconstricción y vasodilatación: los metabolitos del CYP presentan efectos paracrinos y autocrinos descritos en endotelio y músculo liso vascular a través de cascadas metabólicas mediadas por segundos mensajeros. Existe incluso la posibilidad de que la activación de los canales de K<sup>+</sup> calcio dependientes se produzca a través de estas cascadas, en vez de por influencia directa. Se cree que esta cascada incluye la ribosilación de proteínas celulares como la Gs-alfa (Li et al., 1999).

La vía de señalización intracelular de EETs y 20-HETE no está del todo clara. Existe la posibilidad de un receptor de membrana de alta afinidad, como encontramos en monolitos de cobaya; como son sustancias lipofílicas, podrían dirigirse al espacio intracelular donde se asociarían a segundos mensajeros (Chen et al., 1999).

## 1.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS A DISFUNCIÓN PURINÉRGICA

Hace tiempo que se conoce el gran potencial terapéutico de los purinorreceptores (Daly, 1982; Daval et al., 1991; Jacobson et al., 1992; Stone, 1992; Williams, 1993).

Además la larga variabilidad de los subtipos de purinorreceptores P2 en los diferentes tejidos abre la posibilidad de desarrollar drogas específicas cuyo mecanismo de acción sea mediado por purinorreceptores en los diferentes tejidos y órganos humanos.

#### 1.4.1 Diabetes

Se ha demostrado a través de un gran número de estudios que los purinorreceptores P2y están presentes en las células Beta pancreáticas secretoras de insulina.

La activación de este receptor estimula la secreción de insulina a través de la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular mediado por la fosfolipasa C, lo cual provoca un mejor aprovechamiento de la glucosa y por lo tanto mejora la tolerabilidad sistémica de la glucosa. El agonista del purinorreceptor P2y (ADP Beta S) ha demostrado ser efectivo tras la administración por vía oral (Hillaire-Buys et al., 1993) como estimulador de la secreción de insulina. Estos hallazgos sugieren que los purinorreceptores P2y representan una nueva línea de investigación para el desarrollo de antidiabéticos orales.

#### 1.4.2 Cáncer

Se ha demostrado que la activación de los purinorreceptores P2z activa las células natural-killer anticáncer que median los mecanismos de apoptosis (Pizzo et al., 1993; Murgia et al., 1992). La activación de dichos purinorreceptores tiene una actividad positiva en la disminución de la pérdida de peso del paciente oncológico en tumores metastáticos (Rapaport, 1993).

#### 1.4.3 Fibrosis quística

Se ha demostrado que los purinorreceptores P2 regulan el transporte iónico de células epiteliales en una gran variedad de tejidos como por ejemplo el intestino, pulmón y riñón, donde el ATP estimula el transporte de  $Cl^-$  y altera la distribución de Calcio (Burnstock, 1991).

La fibrosis quística es una enfermedad genética letal que se caracteriza por la regulación defectuosa del transporte del ión  $Cl^-$  en el epitelio alveolar, lo cual provoca formación de moco muy poco hidratado produciendo obstrucción de la vía aérea (Noone and Knowles, 1993).

Se ha observado que el ATP y el UTP tienen un efecto potenciador del transporte del ión  $Cl^-$  en la mucosa nasal humana a través de la activación de la fosfolipasa C y mecanismos dependientes del  $Ca^{2+}$  (Stutts et al., 1992).

Otros hallazgos han demostrado la regulación del transporte del ión  $Cl^-$  por el ATP y el UTP en el epitelio nasal de pacientes con fibrosis quística (Clarke y Boucher, 1992).

Todo ello sugiere la hipótesis terapéutica de que los purinorreceptores P2 pueden tener un papel importante en la normalización del transporte de  $Cl^-$  en el epitelio alveolar.

#### **1.4.4 Hipertensión Pulmonar**

Los purinorreceptores P2x pulmonares provocan vasoconstricción mediada por el ATP (McCormack et al., 1993). Basado en el principio anterior, los antagonistas al ATP/UTP pueden presentar un potencial terapéutico en la hipertensión pulmonar.

#### **1.4.5 Surfactante y secreción de mucina**

Se ha demostrado que el ATP aumenta los niveles de mucina en el pulmón, a través de la producción de inositol fosfato (Kim et al., 1993), sugiriendo un papel en las propiedades viscoelásticas pulmonares y por lo tanto una defensa contra las partículas aéreas. También se ha demostrado la relación entre los purinorreceptores P2 asociados al mecanismo Fosfolipasa C en los neumocitos tipo II que son las células pulmonares responsables de la secreción del surfactante (Griese et al., 1993). La activación de este receptor provoca un aumento de la secreción de surfactante en el lecho bronquial.

En algunos tipos de neumonía, la insuficiencia respiratoria asociada se puede atribuir a la deficiencia de surfactante (Lachmann y Gommers, 1993), por lo que sería posible el uso de análogos del ATP para aumentar el surfactante en estas patologías.

#### **1.4.6 Fallo renal/insuficiencia renal**

El fallo renal agudo está provocado por la isquemia renal. Los análogos del ATP que estimulan los purinorreceptores P2y pueden aumentar el flujo renal (Churchill y Ellis, 1993). La estimulación con ATP exógeno estimula la proliferación de células mesangiales en la glomerulonefritis (Schulze-Lohoff et al., 1992).

Los antagonistas específicos purinorreceptores P2 pueden tener un potencial efecto en la modulación de procesos anti-inflamatorios en determinadas enfermedades renales.

#### **1.4.7 Otras patologías y circunstancias**

##### **1.4.7.1 En huesos y cartílagos**

Se especula con que el bloqueo de los receptores osteoblásticos por antagonistas P2y purinorreceptores puede ser beneficioso en patologías que se caracterizan por excesiva desmineralización como la osteoporosis.

##### **1.4.7.2 En incontinencia urinaria**

El ATP se ha demostrado que está involucrado como transmisor responsable de la contracción del músculo detrusor por la estimulación nerviosa transmural (Burnstock et al., 1972; Burnstock et al., 1978). Dicho efecto se realiza a través de los purinorreceptores P2x (Burnstock y Kennedy, 1985; Bo y Burnstock, 1990).



Se ha demostrado que en la cistitis intersticial (enfermedad crónica renal que se caracteriza por la incontinencia) hay un incremento patológico de la sensibilidad del músculo detrusor a análogos al ATP (Palea et al., 1993), abriendo de esta forma la posibilidad por medio de antagonistas selectivos P2x al tratamiento de enfermedades crónicas que se caracterizan por la disuria.

#### **1.4.7.3 En trombosis**

Se ha observado que el ATP produce antiagregación plaquetaria (Cusack y Hourani, 1982), lo cual es interesante en el futuro desarrollo de agentes anti-trombóticos.

#### **1.4.7.4 En taquicardia ventricular**

Han sido recomendados los antagonistas P1 y P2 purinorreceptores para el tratamiento de la taquicardia ventricular (Belhassen y Pelleg, 1984).

#### **1.4.7.5 En tracto gastro-intestinal**

Se han identificado purinorreceptores P2 (en la mayoría de los casos P2y que median vasodilatación) en el estómago, fibra muscular lisa intestinal, ganglios intestinales y en el endotelio de los vasos gastro-intestinales (Hoyle y Burnstock, 1991; Burnstock et al., 1994). Se abre la posibilidad de desarrollar agentes con potencial terapéutico en disfunciones gastro-intestinales.

#### **1.4.7.6 En sistema nervioso central**

Se ha demostrado la presencia de purinorreceptores P2 en el SNC, lo cual abre la posibilidad de desarrollar agentes farmacológicos para el tratamiento de la epilepsia, depresión ó enfermedades neurodegenerativas (Burnstock, 1993; Williams, 1993).

#### **1.4.7.7 En reproducción humana**

Se ha demostrado la presencia de receptores del ATP en espermatozoides (Foresta et al., 1992) y células amnióticas humanas (Vander Kooy et al., 1989).

#### **1.4.7.8 En ojos**

Se ha demostrado la presencia de receptores P2x2 y P2x3 en las células ganglionares de la retina. Los receptores P2x3 también están presentes en las células de Müller, las cuales segregan ATP mediante mecanismos iónicos de liberación de  $Ca^{++}$ . El ATP activa los dos tipos de purinorreceptores, P2x y P2y, modulando la neurotransmisión en la retina y por lo tanto afectando al flujo sanguíneo de la retina y a la presión intraocular.

Se ha propuesto la aplicación tópica de diadenosina tetrafosfato para el control de la presión intraocular en el glaucoma.

#### **1.4.7.9 En oído**

Se ha identificado a purinorreceptores P2x y P2y en el sistema vestibular. El ATP regula el flujo sanguíneo coclear, por lo que puede ser útil en el tratamiento de la Enfermedad de Menière, tinnitus y trastornos neurosensoriales.

#### **1.4.7.10 En órganos nasales**

Se ha demostrado la presencia de P2x2, P2x3 y P2x2/3 en los nervios olfatorios de la mucosa nasal, lo cual puede provocar un aumento de ATP en respuesta a estímulos nocivos nasales y activar los receptores P2x y provocar una modulación endógena disminuyendo la sensibilidad olorosa

### **1.5 ALTERACIONES DE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN DIFERENTES SITUACIONES FISIOPATOLOGICAS.**

#### **1.5.1 Reactividad vascular en el fenómeno de isquemia repercusión.**

Se sabe que la isquemia seguida de perfusión puede causar daño estructural y funcional no solo en el parénquima sino también en los vasos que suplen a dicho órgano. En la cirugía del trasplante renal es inevitable el clampage de la arteria renal por algún tiempo y se espera por tanto que la perfusión que sigue a la retirada del clamp cause un daño estructural en los vasos de los que puede resultar un déficit funcional arterial. El proceso de isquemia- perfusión es una complicación importante de la cirugía aórtica y renovascular, especialmente después del trasplante.

Por otro lado, el fenómeno de lesión por isquemia-reperfusión se acompaña de cambios importantes en la función vascular en condiciones basales y de reactividad en la mayoría de los órganos. Hay similitudes en los órganos con afectación de la función vascular, particularmente en las primeras 24-48 horas, con una importante disminución del flujo sanguíneo orgánico, hipersensibilidad al estímulo vasoconstrictor, atenuación a la respuesta a vasodilatadores e incremento de la permeabilidad vascular. La reducción en la respuesta a los vasodilatadores dependientes del endotelio puede deberse a una reducción en la actividad de la NOS endotelial.

Hay notables diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en la respuesta vasoreactiva tras la isquemia-reperfusión en los diferentes órganos como riñón, corazón y cerebro, debido a mecanismos aún no conocidos totalmente. También se han observado diferencias regionales en el endotelio y/o parénquima orgánico.

La lesión causada por el mecanismo de isquemia-reperfusión en el riñón se asocia a la pérdida de autorregulación, incremento de la resistencia vascular, disminución del flujo sanguíneo renal y por último fallo renal agudo (Cristol JP et al, 1993).

#### **1.5.1.1 Respuesta a vasoconstrictores**

La respuesta a agentes vasoconstrictores se ha estudiado en diferentes órganos encontrándose resultados contradictorios. A pesar de estas discrepancias los artículos de revisión describen un aumento de reactividad a los agentes vasoconstrictores (Conger JD, 1995), fenómeno que es más teórico que real, como se puede observar en la descripción detallada de los trabajos que se citan a continuación.

Olouglu C et al, 1991 observaron una marcada reducción en la sensibilidad a AII que casi pierde su efecto vasoconstrictor en conejos anestesiados con nefrectomía derecha y una hora de clampage de la arteria renal izquierda seguido de 30 minutos de perfusión sanguínea Conger JD et al, 1992 estudiaron el efecto del clampage de la arteria renal durante 75 minutos o la administración intrarrenal de norepinefrina a una dosis que produce una reducción del 10-15% del flujo sanguíneo renal en ratas y analizó la reactividad renovascular en una semana. Hubo una respuesta vasoconstrictora a la norepinefrina intrarrenal tempranamente pero poco significativa tardíamente.

Los autores concluyen que diferentes modelos de inducción de isquemia y perfusión resultan en diferentes patrones de respuesta vascular postisquémica, los cuales producen diferente daño en músculo liso vascular y endotelio, lo que está en consonancia con un trabajo previo del mismo grupo (Conger JD, 1991) que demuestra que el fallo renal agudo inducido por noradrenalina muestra evidencias de lesión vascular endotelial, mientras que el inducido por el clampage de la arteria renal presenta evidencias morfológicas y funcionales de lesión predominante del músculo liso.

Pruneau et al, 1993 estudian anillos aislados de arteria renal y encuentran que las curvas dosis-respuesta para KCl, NA, 5-HT, AII estaban inalteradas después del fenómeno de isquemia – perfusión. Por su parte, Verbeke et al en 1996 observaron que la vasoconstricción inducida por la serotonina en los lechos vasculares renales estaba aumentada después de la isquemia en el animal intacto Mientras que Mik’o I, 1997 encuentra que el clampage traumático de las arterias renales durante 60 minutos produce un descenso irreversible de la contractilidad a noradrenalina, incluso si se hace hipotermia o se administra tratamiento antioxidante simultáneamente.

Los estudios en isquemia-reperfusión en la circulación coronaria han aportado unos datos más homogéneos indicando un aumento de respuesta a los agentes presores.

Así, VanBenthuisen KM en 1987 observa que la reperfusión después del clampage coronario en los perros aumenta la reactividad contráctil *in vitro*. Se estudiaron anillos arteriales de perros anestesiados tras 60 minutos de clampage coronario y reperfusión posterior, obteniendo los datos de que la isquemia sin reperfusión empeora la respuesta contráctil al KCl, sin embargo la isquemia seguida de perfusión aumentaba la respuesta contráctil a KCl y ergonivine. Estos autores también mostraron que el pretratamiento con verapamil restaura las respuestas contráctiles del KCl a la normalidad en anillos reperfundidos y recuperaba parcialmente la vasodilatación dependiente del endotelio. Estos datos apoyan la hipótesis de que la reperfusión del miocardio isquémico aumenta la reactividad a agentes vasoconstrictores por el daño celular endotelial, excesivo flujo de calcio y pérdida de la función moduladora vasodilatadora. Yang BC et al, en la misma línea, observan que la oclusión coronaria subtotal en perros seguida de reperfusión provocaba una acumulación de neutrófilos en el miocardio reperfundido y aumenta la respuesta vasoconstrictora a un análogo del tromboxano A<sub>2</sub>.

En la circulación cerebral (Mayhan et al, 1988), encuentran que después de diez minutos de isquemia total y una hora de reperfusión, la respuesta constrictora a la AII y a la serotonina no estaba alterada en los vasos cerebrales. Más recientemente Chen CF et al, 2006 han observado una marcada reducción en la respuesta a Phe en el lecho vascular mesentérico de rata tras 40 minutos de isquemia y 5 h de reperfusión, situación que era corregida mediante el bloqueo de la síntesis de NO.

### **1.5.1.2 Respuesta a vasodilatadores**

La mayoría de los estudios de reactividad vascular en la isquemia-reperfusión han analizado la respuesta a los agentes vasodilatadores endotelio y no endotelio dependientes con el objetivo de analizar el papel de la disfunción endotelial en la elevación de resistencia vascular renal que se produce en este fenómeno. Los resultados en este apartado son también contradictorios en la mayoría de los órganos en parte debido a la gran variedad de protocolos experimentales empleados.

En 1989 Lieberthal et al analizan la RVR en el riñón aislado y perfundido, después de 25 min. de isquemia observaron que la resistencia renal vascular estaba aumentada en los periodos de reperfusión, concluyendo que estaba alterada la actividad de los factores relajantes derivados de endotelio. Esta anomalía en el EDRF puede ser un mecanismo muy importante que contribuye a la vasoconstricción post-isquémica en la vasculatura renal. Por otra parte, Conger JD, 1992 observan que la isquemia producida por el clampage de la arteria renal durante 75 minutos ó la administración en ratas de una dosis de norepinefrina que provoque una bajada del 10-15% del flujo renal basal suprime la respuesta vasodilatadora a Ach en cada grupo al examinar dicha respuesta una semana después de la inducción de las isquemias.

En 1993, Pruneau, encontró resultados contradictorios dependiendo del tramo de la vasculatura renal de conejo estudiado. Así, en los anillos arteriales renales, las curvas dosis-respuesta para Ach

y NP no estaban alteradas después del fenómeno de isquemia-reperfusión. Bajo las mismas condiciones, la relajación de las arterias arcuatas producido por la Ach estaba reducida cuando los vasos estaban contraídos con metoxamina pero no con KCl, lo que indica que la relajación NO dependiente no está afectada y si la vía del factor hiperpolarizante. La relajación a NP no estaba afectada. Se vio en estudios realizados en conejos anestesiados que el flujo sanguíneo renal y las resistencias vasculares renales no estaban alteradas por el mecanismo de isquemia-reperfusión. La Ach reduce las resistencias vasculares renales, pero esta acción tampoco está alterada después del mecanismo de isquemia-reperfusión. Todos los anteriores resultados nos demuestran que la vasculatura renal del conejo es relativamente resistente al fenómeno de isquemia y por lo tanto este mecanismo probablemente no esté involucrado en el desarrollo del fallo renal post-isquémico. En 1993, Magnusson estudia la respuesta vascular renal a vasodilatadores tras isquemia caliente 30 min. y preservación en frío (24-48 h) en riñones de perro. Se analizó la respuesta vasodilatadora endotelio (Ach) y no endotelio dependiente. La respuesta a Ach se encontró reducida mientras que la respuesta a NP no se modificó. Se concluye que el mecanismo isquémico produce daño vascular endotelial con la consecuente pérdida de la capacidad de liberar factores relajantes en respuesta a la administración de Ach. Igualmente, Cristol JP et al ,1993 propusieron en estudios en ratas anestesiadas que tras la isquemia aguda renal seguido de 2h y 6h de perfusión se producía una importante reducción en el flujo renal basal y un incremento en las resistencias vasculares renales así como una disminución de los efectos vasodilatadores de la Ach .En el lecho vascular coronario VanBenthuyssen KM et al ,1987 observan que la perfusión después de 60 minutos de clampage coronario en perros anestesiados produce un deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio provocada por la Ach, sin embargo la respuesta vasodilatadora al NP estaba inalterada. El tratamiento con verapamilo recuperaba solo parcialmente la vasodilatación dependiente del endotelio.

Estos datos apoyan la hipótesis de que la perfusión del miocardio isquémico aumenta el tono vascular por el daño celular endotelial, excesivo flujo de calcio y pérdida de la función moduladora vasodilatadora. En 1993 Yang BC et al, estudiando también el lecho coronario encuentra que la oclusión total de la arteria coronaria seguida de perfusión producía una acumulación de neutrófilos en el miocardio reperfundido y disminuía la vasodilatación dependiente del endotelio tras la oclusión incompleta en perros. La respuesta vasodilatadora a la nitroglicerina por mecanismo endotelio –independiente estaba inalterada.

En el lecho vascular cerebral, tras 10 min. de oclusión bilateral de las carótidas y 10 min. de perfusión se produce una alteración selectiva de la respuesta a Ach, mientras que la respuesta vasodilatadora a NP por mecanismo endotelio-independiente estaba inalterada (Roseblum WI, 1997). Los autores sugieren que la capacidad de la Ach mediada por el endotelio para sintetizar y/o liberar EDRF está disminuida durante la isquemia.

### 1.5.2 Reactividad vascular y diferencias de género.

En modelos animales se han observado diferencias asociadas al género en la regulación de la presión sanguínea (Chen, 1996; Reckelhoff, 2001). En modelos genéticos de hipertensión, en ratas SHR (espontáneamente hipertensas), los machos tenían una mayor presión sanguínea comparada con hembras de edad similar (<biblio>) ó en modelos animales con ratas genéticamente hipertensas New Zealand (Ashton y Balment, 1991). Tras dieta alta en sodio la presión sanguínea se incrementa más rápidamente en machos que en hembras (Rowland y Fregly, 1992). Es evidente que las hormonas sexuales juegan un papel importante en los diferentes niveles de presión sanguínea en machos y hembras. Diferentes estudios han demostrado que en ratas SHR la orquiectomía a la edad de 4 semanas disminuía de forma muy significativa la elevación de la presión sanguínea en machos y que la ovariectomía a la misma edad en el mismo grupo de ratas SHR no tenía efectos en la hembra (Chen y Meng, 1991; Reckelhoff et al, 1999). Hay evidencias de que en la hipertensión secundaria la orquiectomía altera el curso de la hipertensión (Masabuchi et al, 1982; Crofton et al, 1989; Malyusz et al, 1985) Dos son los motivos por los que se han atribuido las diferencias de cifras tensionales según el sexo, por un lado el efecto protector que tienen los estrógenos en las hembras y por otro lado la actividad pro-hipertensiva de la testosterona. De esta forma, la pérdida de estrógenos con la menopausia podría jugar un papel importante en el aumento de la presión sanguínea en la mujer post-menopáusica. Otros estudios no han demostrado que la terapia sustitutiva con estrógenos hayan disminuido los niveles de presión sanguínea (Reckelhoff, 2001; Verhagen et al, 2000). En estudios animales, el 17-beta-estradiol protege contra el desarrollo de hipertensión en hembras (Sasaki et al, 2000). Este mecanismo protector de los estrógenos se debe a la activación de la síntesis de óxido nítrico en las células endoteliales (Chen et al, 1999). De la misma forma los estrógenos también pueden tener la función de aumentar la expresión genética de la síntesis de NO (Weiner et al, 1994). Todos los estudios nos indican que los estrógenos tienen su efecto protector a través de la vía del NO.

Por otro lado la testosterona ha mostrado que induce hipertensión en ratas (Colby et al, 1970) y recientemente se ha documentado que contribuye a la exacerbación de la hipertensión en ratas SHR porque disminuye el mecanismo de presión-natriuresis e incrementa la actividad plasmática de renina (PRA) (Reckelhoff et al, 1998). El género y los niveles de hormonas sexual en ratas se han asociado con diferencias en la reactividad vascular (Altura, 1972; Huang et al, 1997; Kauser y Rubanyi, 1994; Li y Duckles, 1994; McCulloch y Randall, 1998 ; Sanchez et al, 1996 ) y en la hemodinámica renal ( Munger y Baylis, 1988 ). Los **estrógenos** aumentan la producción endotelial del NO (Hayashi et al., 1995; Weiner et al., 1994) y también modula el EDHF (Campbell y Gauthier, 2002; McCulloch y Randall, 1998), sugiriendo que los estrógenos tienen un efecto pro-vasodilatador. Por otro lado la **testosterona** incrementa la respuesta vascular a la noradrenalina (Bhargava et al., 1967). Sin embargo los resultados de las respuestas a vasoconstrictores (Altura 1972; Collis y Vanhoutte, 1977; Li y Duckles, 1994; Sánchez et al.,

1996; Stallone et al., 1991) y a vasodilatación dependiente del endotelio (Li y Duckles, 1994; McCulloch y Randall, 1998; Sánchez et al., 1996; White et al., 2000) en ratas machos y hembras son muy contradictorios.

Diversos estudios sobre la contribución del NO y del EDHF a la vasodilatación dependiente del endotelio en ratas machos y hembras muestran resultados contradictorios (Golding y Kepler, 2001; Liu et al., 2001; McCulloch y Randall, 1998; Sánchez et al., 1996; White et al., 2000).

En estudios recientes, nuestro grupo (Wangenstein et al., 2004), ha demostrado que la atenuada respuesta presora renal a vasoconstrictores en preparaciones hembra, está relacionada con un aumento de la actividad de los factores relajantes derivados de endotelio, NO y EDHF. Además, no se han encontrado diferencias en la respuesta a vasodilatadores dependientes o no del endotelio entre riñones macho y hembra. Finalmente, la contribución relativa del NO y EDHF a la vasodilatación endotelio-dependiente inducida por la acetilcolina en el lecho vascular renal es similar en ratas macho y hembra.

### **1.5.3 Reactividad vascular en la hipertensión espontánea**

El endotelio vascular es un órgano diana de la hipertensión ya que, como consecuencia de su localización, está expuesto a las fuerzas mecánicas sanguíneas. El principal mecanismo inductor y mediador de la disfunción endotelial hipertensiva es la presión arterial elevada, responsable de un incremento de las fuerzas de cizallamiento sobre las células endoteliales vasculares. Ello puede dar lugar a modificaciones estructurales y/o funcionales que afectan a la producción, a la liberación y a los efectos de los distintos agentes vasoactivos (Lüscher, 1990). La disfunción endotelial se manifiesta como una reducida respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio, o como una mayor respuesta constrictora (dependiente ó independiente del endotelio), ambas resultantes de una alteración del equilibrio que normalmente existe entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores (Lahera et al., 1997). Este desequilibrio conlleva una elevación de las resistencias vasculares periféricas totales y el mantenimiento o agravamiento de la hipertensión arterial.

Se ha observado, tanto en hipertensos esenciales como en modelos experimentales de hipertensión, una alteración en la regulación inducida por NO. Varios estudios han demostrado que, en estos casos, se reduce la liberación de NO (Tschudi et al., 1996; Cosentino et al., 1998) y, en consecuencia, también la vasodilatación dependiente de NO (Panza et al., 1993; Lüscher y Vanhoutte, 1986). Esto indica que la hipertensión está relacionada con la disfunción endotelial subyacente en la reducida biodisponibilidad de NO. Sin embargo, esta conclusión se sostiene principalmente por los resultados obtenidos con agonistas que estimulan la formación de NO, pero los datos referentes a la regulación basal del NO en hipertensión son contradictorios. En ratas SHR, los efectos vasoconstrictores observados con inhibidores de NO y la expresión y actividad de la NOS pueden estar incrementadas (Nava et al., 1998; Vaziri et al., 1998; Radaelli

et al., 1998; Maffei et al., 2002) ó disminuidas (Chou et al., 1998). También existen discordancias entre los resultados obtenidos con otros indicadores de la síntesis de NO, como la concentración en plasma y orina de metabolitos de NO (Vaziri et al., 1998) o la formación de CMPC (Nava et al., 1998; Rueten et al., 1999). Por lo tanto, la regulación de NO basal en la hipertensión no está suficientemente aclarada. El aumento de la formación basal de NO se interpreta como un intento ineficaz, por parte del endotelio, para equilibrar la excesiva producción vascular de radicales libres derivada del incremento del catabolismo de NO (Nava et al., 1998). En definitiva, aunque la disfunción endotelial hipertensiva se entienda como una respuesta defectuosa a la estimulación de la liberación de NO por agonistas, este concepto tiene que ser también aplicado a la producción de NO basal.

Todos los estudios que se han realizado para analizar la función endotelial en hipertensión han utilizado métodos indirectos (expresión o actividad de NOS, determinación de metabolitos de NO, etc.), lo que supone ciertas limitaciones. La medida directa de la producción de NO requiere técnicas sofisticadas-debido a su vida media corta y a que se produce en muy poca cantidad-como la fluorescencia DAF-2, que ha permitido observar, en anillos aórticos de SHR, un incremento en la producción de NO basal y una respuesta menor a la liberación de NO inducida por agonistas en comparación con sus controles, las ratas WKY (Maffei et al., 2002).

También se ha sugerido que una producción exagerada de radicales libres, como el  $O_2^-$  sea responsable de la disfunción endotelial en el modelo SHR (Grunfeld et al., 1995; Suzuki et al., 1995). De hecho, la reducción de la producción de  $O_2^-$  mediante aloxantina, un inhibidor de la xantina oxidasa (Miyamoto et al., 1996), o mediante CuZn superóxido dismutasa (Nakazono et al., 1991) disminuye de forma aguda la presión arterial en ratas SHR. También se ha descrito que la administración crónica de antioxidantes como la vitamina E (Chen et al., 2001) revierte la disfunción endotelial hipertensiva y reduce la presión arterial. Estos  $O_2^-$  tienen la capacidad de oxidar el NO (eliminan, así, su efecto beneficioso) y producir peroxinitrito, que tiene una potente acción oxidante y produce lesión celular a nivel estructural y molecular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). El peroxinitrito ataca al AA y produce Iso-PGF2alfa, que es un potente vasoconstrictor e incrementa la presión arterial (Morrow y Roberts, 1996). Además, varios estudios han demostrado que los  $O_2^-$  pueden actuar como vasoconstrictores (Auch-Schwelk et al., 1989; Cosentino et al., 1994) y estimulantes de la proliferación celular por sus efectos mitogénicos directos sobre las CMLV (Rao y Berk, 1992; Conger et al., 1996).

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la disfunción endotelial en ratas SHR es el aumento de la producción de un factor endotelial constrictor. Se especula con un derivado prostanoide del tipo prostaglandina H2/TXA2 que podría expresarse localmente en exceso, puesto que la incubación de anillos aórticos de animales SHR en presencia de un inhibidor de la COX, indometacina, reduce la disfunción endotelial en respuesta a la Ach (Lahera et al., 1993; Lüscher et al., 1990).



## **2. PLANTEAMIENTO**

## **2 PLANTEAMIENTO**

### **2.1 CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES RELAJANTES DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS P2Y**

Los nucleótidos de purinas y pirimidinas como el ATP, ADP y UTP fueron reconocidos como sustancias con importantes propiedades vasoactivas en diferentes lechos vasculares (Olsson y Pearson 1990; Ralevic y Burnstock 1991). Los efectos vasodilatadores de estas sustancias son mediados por diferentes purinorreceptores P2y localizados en el endotelio vascular. Los purinorreceptores P2y1 (antiguamente P2y) son estimulados preferentemente por el agonista fisiológico ADP y el purinoreceptor P2y2 (antiguamente P2u) por el UTP ó ATP (Ralevic y Burnstock 1998).

La estimulación de los purinorreceptores P2y en el endotelio de las fibras musculares lisas provoca una liberación de factores relajantes derivados del endotelio. Esta vasodilatación mediada por dichos factores derivados del endotelio incluye al 1) NO ( Palmer et al 1987 ), 2) al factor derivado del endotelio hiperpolarizado ( factor EDHF ) y a 3) otras sustancias no identificadas que relajan la vasculatura de la fibra muscular lisa a través de una hiperpolarización como resultado de una apertura de los canales de potasio ( Feletou y Vanhoutte 1999 ; Garland et al 1995; Mombouli y Vanhoutte 1997 ; Quilley et al 1997 ) 4) prostaglandinas ( PGS ) ( Koller et al 1989 ).

Los mediadores endoteliales de la mayoría de los purinorreceptores P2y han sido descritos en la circulación cerebral (You et al 1997 ; Marelli et al 1999), donde la estimulación de los purinorreceptores P2y1 se obtenía a través del incremento de NO y EDHF (You et al 1997)

Respecto a la vasculatura renal se determinó que el NO es un importante factor derivado del endotelio que media en la vasodilatación a través de los purinorreceptores P2y1 en los vasos de los riñones aislados de las ratas, pero sólo es responsable parcialmente de este efecto (Churchill y Ellis 1993). Hay otros mediadores diferentes al NO implicados en la actividad vasodilatadora del 2-metil ATP, el agonista específico para los purinorreceptores P2y1.

En un estudio previo, nuestro grupo identificó mecanismos dependientes de EDHF y NO como componentes distintos de la vasodilatación inducida por Ach en el riñón aislado y perfundido de rata. (Vargas et al., 1994).

### **2.2 REACTIVIDAD RENAL VASCULAR A LOS P2 PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)**

La adenosina 5 trifosfato (ATP) puede influir en el sistema cardiovascular bajo condiciones fisiológicas y anormales (Burnstock y Kennedy, 1985; Olson y Pearson, 1990). Se ha definido que el ATP puede tener un efecto dual (vasoconstrictor ó vasodilatador) en la regulación del tono vascular (Gordon., 1986; Ralevic y Burnstock, 1991). El efecto vasoconstrictor y

vasodilatador está mediada a través de diferentes receptores. Así, la vasoconstricción se produce por la activación de p2x purinoreceptores, mientras que la vasodilatación se produce por la activación de p2y purinoreceptores localizados en las células endoteliales vasculares produciendo óxido nítrico. El resultado de varios estudios han confirmado la presencia de ambos p2 purinoreceptores en el sistema vascular renal (Churchill y Ellis., 1993; Vargas et al., 1996) y se han detectado anomalías en la reactividad p2 purinérgica en casos aislados por envejecimiento (Vargas et al., 1996) y en ratas con hipotiroidismo (Vargas et al., 1996).

En este estudio suponemos que en un desequilibrio entre la reactividad purinérgica del p2x (vasoconstricción) y el p2y (vasodilatación) puede aumentar la resistencia vascular y además contribuir a la hipertensión espontánea. Se ha descrito en anillos de aorta de ratas SHR una disminución en la respuesta vasodilatadora al ATP (Mombouli y Vanhoutte., 1993).

En el presente estudio definimos la respuesta vasoactiva a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP y al 2metiltioATP, agonistas específicos respectivamente para P2x y p2y purinoreceptores en riñones aislados y perfundidos de ratas SHR y WistarKyoto (WKY).

### **2.3 REACTIVIDAD VASCULAR EN EL FENÓMENO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

Se ha demostrado una disfunción endotelial en los vasos cerebrales tras un mecanismo de isquemia-reperfusión. Roseblum demostró en las arteriolas cerebrales del ratón que tras 10 minutos de oclusión arteriolar seguidos de 10 minutos de perfusión había una disminución de la vasodilatación inducida por Ach pero no estaba afectada la vasodilatación producida por BK ó NP, ambos dependientes del endotelio.

Estos resultados nos indican que los mecanismos vasodilatadores dependientes del endotelio pueden verse alterados de forma diferente por el mecanismo de isquemia-reperfusión.

Este estudio enfatiza el hecho de que el mecanismo de isquemia-reperfusión puede afectar a algún sistema de receptores involucrados en la vasodilatación mediada por el endotelio sin afectar a otros grupos vasodilatadores no dependientes del endotelio. Creemos que es importante la consideración de sistemas de receptores cuando estamos evaluando la vasodilatación mediada por el endotelio tras el mecanismo de isquemia-reperfusión. Los efectos de la isquemia-reperfusión en la reactividad purinérgica no han sido estudiados en la circulación renal aunque sí en modelos de arterias coronarias y arteria cerebral media, donde sí se han descrito alteraciones en la reactividad P2y-purinérgica, como disminución de la vasodilatación al ADP y una respuesta disminuida a 2MeS-ATP (agonista P2y1) así como un incremento de la respuesta al UTP en arteria cerebral. Debido a los probables efectos específicos que tiene el mecanismo de isquemia-reperfusión en los vasodilatadores dependientes del endotelio y al deterioro de la reactividad P2y purinérgica en las arterias coronarias y cerebral media, es de gran importancia evaluar la respuesta a diferentes vasoconstrictores y vasodilatadores mediados por el sistema purinorreceptor P2 después de la lesión provocada por el mecanismo de isquemia-reperfusión en el lecho vascular renal.

El propósito de este experimento es determinar después de 90 minutos de isquemia e isquemia seguida de 2 a 24 horas de reperfusión, las alteraciones en las respuestas a los vasoconstrictores y vasodilatadores mediadas por los P<sub>2</sub>-purinorreceptores en la vasculatura del riñón aislado. Para hacerlo, determinamos las respuestas vasoactivas a  $\alpha,\beta$ -metilén ATP para los receptores P<sub>2X</sub>-purinérgicos y 2- metiltioATP y UTP , agonistas específicos para, respectivamente, P<sub>2Y1</sub> y P<sub>2Y2</sub> receptores purinérgicos en el riñón aislado y perfundido de la rata.

#### 2.4 CYP 450 Y REACTIVIDAD VASCULAR

Las enzimas del citocromo P450 pueden metabolizar el ácido araquidónico en sustancias con efecto sobre el tono arterial, por lo que llegamos a la conclusión que el sistema enzimático del citocromo P450 (CYP) puede jugar un papel muy importante en la modulación y homeostasis vascular. Hay importantes evidencias que nos indican que la activación de CYP-epoxigenasa en las células endoteliales es un paso esencial para la vasodilatación dependiente del óxido nítrico y prostaciclínas en numerosos lechos vasculares, particularmente en el corazón y riñón. Además, la CYP –epoxigenasa, v-hidroxilasa así como los productos derivados del CYP, son moléculas que actúan como mensajeros provocando una cascada de múltiples procesos intracelulares, entre los que como objetivo último se encuentra la proliferación de células vasculares endoteliales y la angiogénesis. Se han identificado dos metabolitos derivados del CYP, por una parte los ácidos epoxieicosatrienoicos (5,6 EET) y por otro lado el ácido 20-hydroxieicosatetraenoico (20-HETE), los cuales actúan a nivel endotelial y de las fibras musculares lisas provocando efectos vasculares. Ambos metabolitos (5,6 EET) y (20-HETE) se han propuesto como mediadores de la acción de los agentes vasoconstrictores y vasodilatadores respectivamente.

#### 2.5 DIFERENCIAS DE GÉNERO EN REACTIVIDAD VASCULAR.

El sexo y los niveles hormonales se relacionan con diferencias en la reactividad vascular. Los **estrógenos** aumentan la producción endotelial del NO y también modula el EDHF, indicándonos que los estrógenos tienen un efecto pro-vasodilatador. Por otro lado la **testosterona** incrementa la respuesta vascular a la noradrenalina (Bhargava et al., 1967). Sin embargo, los resultados de las respuestas a vasoconstrictores y a vasodilatación dependiente del endotelio en ratas machos y hembras son muy contradictorios, aunque nosotros recientemente hemos podido observar una reactividad vascular renal atenuada para los agentes vasoconstrictores sin cambios para los vasodilatadores (Wangensteen et al, 2004) en ratas hembra.

Teniendo en cuenta que la función purinérgica tiene una doble actividad vascular vasoconstrictora y vasodilatadora hemos planteado la hipótesis de que un desequilibrio entre la

actividad funcional de los purinorreceptores podría contribuir al dimorfismo sexual respecto a la presión arterial.

### **3. OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES RELAJANTES DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS P<sub>2Y</sub> PURINORRECEPTORES.**

El estudio fue diseñado para determinar la presencia de ambos P<sub>2</sub>-purinoreceptores y para definir la contribución del NO, EDHF y PGs a los efectos vasodilatadores de la activación de P<sub>2y1</sub> y P<sub>2y2</sub> en la vasculatura renal.

#### **3.2 REACTIVIDAD VASCULAR RENAL A LOS P<sub>2</sub>-PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).**

Este estudio fue diseñado para determinar la posible contribución de un desequilibrio entre la reactividad purinérgica P<sub>2x</sub> (vasoconstricción) y P<sub>2y</sub> (vasodilatación), al incremento de la resistencia vascular de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Para ello se observó la respuesta vasoactiva a  $\alpha,\beta$ -metilénATP y al 2-metiltioATP, agonistas específicos respectivamente para P<sub>2x</sub> y P<sub>2y</sub> purinorreceptores en riñones aislados y perfundidos de ratas SHR y Wistar Kyoto (WKY).

#### **3.3 REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA TRAS EL FENÓMENO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

El objetivo del estudio fue determinar tras 90 minutos de isquemia y de 2 a 24 horas de reperfusión, las respuestas a la vasoconstricción y vasodilatación mediada por p<sub>2</sub>-receptores en la vasculatura del riñón aislado y perfundido. Para ello se utilizaron las respuestas vasoactivas del  $\alpha,\beta$ -metilénATP para los P<sub>2x</sub> purinorreceptores y del 2-metiltioATP y UTP para P<sub>2y1</sub> y P<sub>2y2</sub> receptores respectivamente.

#### **3.4 PAPEL DE LOS DERIVADOS DEL CYP P450 EN LA REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA.**

En este apartado nos propusimos analizar la contribución de los derivados del ácido araquidónico 5,6 EET y 20 HETE, generados por la acción de la CYP 450 monooxigenasa, a la acción de los agonistas purinérgicos P<sub>2X</sub> y P<sub>2Y</sub> con acción vasoconstrictora y vasodilatadora respectivamente, en el lecho vascular renal de rata.

#### **3.5 REACTIVIDAD VASCULAR Y DIFERENCIAS DE GÉNERO.**

Con el objeto de valorar si cambios en la reactividad vascular renal P<sub>2</sub>-purinérgica pueden contribuir al dimorfismo sexual respecto a la presión arterial se analizó la reactividad P<sub>2X</sub> (vasoconstricción) y P<sub>2Y</sub> (vasodilatación) – purinérgica en machos y hembras.

#### **4 .MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 ANIMALES**

#### **4.1.1 Animales en experimentos de reactividad vascular renal a los p2 purinorreceptores en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)**

Se utilizaron ratas macho adultas (5 meses) SHR y WKY nacidas y criadas en el animalario de la Universidad de Murcia. El tamaño de muestra en el estudio fue n=14 en cada grupo. Los animales fueron alimentados con una comida estándar y agua. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el tratamiento ético de animales de la Unión Europea.

#### **4.1.2 Animales en experimentos de contribución de los factores relajantes del endotelio a la vasodilatación inducida por la activación de los purinorreceptores P2y.**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas nacidas y criadas en el animalario de la Universidad de Murcia, se utilizaron como tamaño de muestra en el estudio n=7. Los animales fueron alimentados con comida estándar y agua. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el tratamiento ético de animales de la Unión Europea.

#### **4.1.3 Animales en experimentos isquemia-reperfusión**

Se utilizaron riñones procedentes de ratas Wistar macho de 300-350 g que fueron estudiados en las siguientes condiciones: **a)** condiciones normales, **b)** después de 90 min de isquemia, **c)** después de 90 min de isquemia y 2h de perfusión, **d)** después de 90 min de isquemia y 24h de perfusión y **e)** después de 90 min de isquemia bilateral y 24h de perfusión.

#### **4.1.4 Animales en experimentos citocromo p450 y reactividad vascular**

Se utilizaron 28 ratas Wistar macho, de 18 a 20 semanas de edad, nacidas y criadas en el animalario de la Universidad de Granada. Se asignaron 7 ratas a cada grupo experimental. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el tratamiento ético de animales de la Unión Europea.

#### **4.1.5 Animales en experimentos de reactividad vascular y diferencias de género**

Se utilizaron machos y hembras de similar edad (18-20 semanas), nacidas y criadas en el animalario de la Universidad de Granada. Se utilizaron 7 machos y siete hembras en cada grupo experimental.

## 4.2 PREPARACION DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg). El abdomen fue abierto por medio de una escisión en la línea media y se expusieron las arterias renal izquierda y mesentérica superior.

En orden, con la finalidad de mantener la perfusión renal continua, se canuló la arteria mesentérica superior con una cánula de borde biselado del 18, avanzando dentro de la arteria renal y posteriormente asegurando las ligaduras. El riñón se perfundió con una velocidad de flujo constante ( 5 ml/g de peso de riñón por minuto) mediante una bomba de perfusión ( IPS-4, Ismatec, Zurich ), con solución de Tyrode ( 37 °C ), con la siguiente composición ( en mM ): NaCl 137, KCl 2,7;CaCl 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.1,NaHCO<sub>3</sub> 12,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42, D+glucosa 5.6 y aireada con 5% CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>. El riñón se extirpó quirúrgicamente liberándolo de los tejidos adyacentes y se situó en una cámara contenedor con solución de Tyrode a 37 °C.

Las respuestas vasculares renales fueron grabadas y registradas (TRA 0211 transductor conectado a 2 canales Letigraph 2000 recorder, Leticia, Barcelona), como cambios en la presión de perfusión renal (PPR).

## 4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

### 4.3.1 Protocolo experimental nº1: Reactividad vascular renal purinérgica en ratas espontáneamente hipetensas (SHR).

Se evaluaron los efectos de la respuesta renal a los agonistas de P2 purinorreceptores en presencia de: 1) L-NAME, un inhibidor de la síntesis del NO (Ishii et al ,1990) 2) incrementando el potasio extracelular bloqueando un inespecífico canal de potasio (Adeagbo y Triggle, 1993) 3) indometacina como inhibidor de las PGs (Bhardwaj y Moore, 1998) 4) L-NAME + incremento de la concentración de K<sup>+</sup>.

Los inhibidores fueron administrados a la perfusión en las siguientes concentraciones: 10<sup>-4</sup> M L-NAME, 25 mM K<sup>+</sup> y 10<sup>-5</sup> M indometacina (disuelta en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M).

En experimentos preliminares, el incremento extracelular de K<sup>+</sup> a 25 mM no modificó significativamente la curva D-R al NO donante de NP. Después de 30 min de periodo de estabilización la vasculatura renal fue vasoconstrañada con Phe infundida a la dosis de 10<sup>-6</sup> M en la perfusión. Después de 20 min de periodo de estabilización se obtuvieron las curvas D-R a ATP (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-7</sup> M) 2-metil tio ATP (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-9</sup> M) y a UTP (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-8</sup> M) bajo condiciones normales y treinta minutos después de la administración de los inhibidores.

Cuando los inhibidores fueron administrados, la dosis de Phe fue ajustada hasta alcanzar un incremento similar en presión de perfusión renal que la observada en preparaciones de control (126±3 mmHg). Las curvas D-R se realizaron tras la inyección en bolo de 50 microlitros de

agonistas. La inyección de estos volúmenes causó un pequeño y transitorio incremento de la PPR que precedía a la respuesta provocada intrínsecamente por el agonista.

Para controlar que la respuesta no era causa de un artefacto se daba una inyección de control en cada preparación. El tiempo mínimo de intervalo entre dosis sucesivas de un agonista era de 5 minutos. El tiempo mínimo de intervalo entre la administración de diferentes agonistas fue 15 minutos. Se compararon las curvas D-R en presencia de inhibidores con las curvas D-R en condiciones normales. Para obtener soluciones conteniendo 25 mM de  $K^+$ , concentraciones equimolares de NaCl fueron reemplazadas por KCL en la solución de Tyrode. Los cambios en PPR como respuesta a los vasodilatadores se expresaron como un porcentaje de la disminución de PPR de la vasoconstricción obtenida con Phe.

#### **4.3.2 Protocolo experimental n°2: Contribución de los factores relajantes del endotelio a la vasodilatación inducida por la activación de los purinorreceptores P2y.**

Después de 30 minutos de equilibrio, se obtuvo la curva D-R al  $\alpha,\beta$ -metilénATP ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  g/gk), Phe ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  g/gk) y cloruro de bario ( $5 \times 10^{-4}$  y  $10^{-2}$  g/gk) inyectando volúmenes constantes (50-100  $\mu$ l/gk) en el sistema de perfusión cerca del riñón. La inyección de estos volúmenes causó un pequeño aumento transitorio en PPR, que precedía a la respuesta agonista evocada. Otros riñones, después de 30 min de equilibrio eran preconstreñidos con fenilefrina infundida para producir una concentración final de  $10^{-6}$  M en la perfusión de la preparación de control. Como la preparación de SHR demostró una sensibilidad creciente a fenilefrina, la dosis de este vasoconstrictor se ajustó para alcanzar un aumento similar en la presión renal de la perfusión ( $124 \pm 2$  mm Hg) a la observada en la preparación de control ( $121 \pm 2$  mmHg). Entonces se obtuvieron las curvas de D-R a 2-metilenoATP ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  g/gk) Ach ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  g / gk) y NP ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  g/gk). El tiempo mínimo entre las dosis sucesivas de agonistas vasoconstrictores y vasodilatadores era de 5 min. Cuando es necesario, estos periodos se prolongaban hasta que había desaparecido la respuesta anterior. El periodo mínimo entre diferentes agonistas era de 15 min. Los cambios en PPR en respuestas a los vasodilatadores fueron expresados como porcentajes de la vasoconstricción obtenida con Phe.

#### **4.3.3 Protocolo experimental n°3: Isquemia-reperfusión y reactividad vascular renal purinérgica.**

Los riñones se estudiaron después de las siguientes condiciones: a) condiciones normales (control). b) 90 min de isquemia c) 90 min isquemia y 2h de perfusión d) 90 min de isquemia y 24 de perfusión e) después de 90 min de isquemia bilateral y 24 h de perfusión.

**4.3.3.1 Experimento n°1:** En este experimento evaluamos los efectos del mecanismo de isquemia e isquemia-reperfusión en la respuesta renal a los vasoconstrictores. Se obtuvieron curvas dosis-

respuesta a  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  g/gk), Phe ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  g/gk) y cloruro de bario ( $5 \times 10^{-3}$ - $10^{-2}$  g/gk), dichas curvas se obtuvieron mediante la administración de bolos de volúmenes constantes (50-100  $\mu$ l/gk) dentro del sistema de perfusión, con el paso al riñón cerrado. La administración en bolo de dichos volúmenes causaba un pequeño y transitorio incremento en la presión de perfusión renal, la cual precedía a la respuesta evocada por el agonista.

**4.3.3.2 Experimento n°2:** Los agonistas utilizados fueron: acetilcolina para evaluar la función endotelial, 2-metil ATP para analizar la función  $P_{2Y1}$ -purinérgica y UTP para determinar la función  $P_{2Y2}$ -purinérgica. Se estudió la respuesta renal al 2-metil ATP, UTP, factores vasodilatadores del endotelio y Ach en riñones bajo condiciones normales o después de procedimientos de isquemia ó I/R. Después de 30 min de equilibrio, los riñones fueron preconstrañidos con fenilefrina infundida a una concentración de  $10^{-6}$  M/l en la perfusión. Como las preparaciones mostraban un aumento de la respuesta a fenilefrina, la dosis de este vasoconstrictor fue ajustada para provocar un incremento similar en la PPR ( $124 \pm 3$  mmHg) que la observada en preparaciones de control ( $121 \pm 2$  mmHg). Entonces, se obtuvieron, la curvas D-R al 2 metil ATP ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  g/gk), UTP ó Ach ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  g/gK) tras la administración de dosis de 50 microlitros cada una. Los cambios en la respuesta de PPR a los vasodilatadores se expresaron como porcentaje de vasoconstricción obtenida con Phe.

#### **4.3.4 Protocolo experimental n°4: Papel de los derivados del citocromo P450 en la reactividad vascular renal purinérgica.**

**4.3.4.1 Experimento n°1:** Se diseñó este experimento para evaluar los efectos del bloqueo de 20-HETE mediante la administración de ácido 17-octadecinoico (ODYA), el cual bloquea la respuesta renal al agonista  $P_{2X}$   $\alpha$ - $\beta$ -Metilén ATP. Además se estudió el efecto de este inhibidor sobre otros agentes vasoconstrictores que se utilizaron como moléculas testigo de efecto vasoconstrictor acoplado y no acoplado a receptor. Hicimos curvas dosis-respuesta al  $\alpha$ - $\beta$  metilén ATP, endotelina y  $H_2O_2$ , en este mismo orden. Dichas curvas dosis-respuesta se realizaron en condiciones basales y después de la infusión de ODYA ( $10^{-4}$  M). Dicho inhibidor se infundió durante un periodo de 30 minutos de estabilización y durante el proceso de realización de las curvas dosis-respuesta.

**4.3.4.2 Experimento n°2:** El siguiente estudio fue diseñado para determinar la contribución de los mediadores intracelulares derivados del CYP-450 vasodilatadores (5,6 EET) a la acción vasodilatadora inducida por la activación  $P_{2Y}$  purinérgica. Se analizó el efecto de la administración de clotrimazol ( $10^{-5}$  M), un inhibidor específico de 5,6 EET sobre la reactividad

vascular renal a 2-metil ATP y como molécula testigo se utilizó el prototipo de vasodilatador endotelio dependiente la Ach.

Las dosis de los agonistas vasoconstrictores y vasodilatadores empleados en este experimento son las que habitualmente se han venido empleando en experimentos anteriores.

#### **4.3.5 Protocolo experimental nº5: Reactividad vascular renal purinérgica y diferencias de género.**

**4.3.5.1 Experimento nº1:** Este experimento se diseñó para estudiar la respuesta renal a los vasoconstrictores purinérgicos- P<sub>2X</sub> de ratas machos y hembra.

Además esta respuesta fue analizada en relación a la respuesta obtenida con agonistas vasoconstrictores acoplados y no acoplados a receptor. Se obtuvieron curvas dosis respuesta a  $\alpha$ - $\beta$  metilén ATP, endotelina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en este orden.

**4.3.5.2 Experimento nº2:** Este experimento fue diseñado para estudiar la reactividad P<sub>2Y</sub> purinérgica relativa a la acción de otro agonista endotelio dependiente la Ach. Las curvas dosis-respuesta a los vasodilatadores se obtuvieron en riñones perfundidos y preconstreñidos con Phe (10<sup>-6</sup> M). Debido a que las preparaciones de ratas hembras nos mostraban una respuesta disminuida a Phe, fue necesario ajustar la concentración de vasoconstrictor hasta lograr un nivel similar de preconstreñimiento en las preparaciones de ratas macho y hembra (112±2 mmHg). Los cambios en la respuesta de la presión perfusión renal a los vasodilatadores se expresó en porcentajes de la vasoconstricción obtenida con Phe.

#### **4.4 DROGAS**

Las drogas que se usaron fueron: Pentobarbital sódico (Nembutal, Serva, Heidelberg, Germany), sal de adenosina 5-trifosfato disódica, 2-metiloadenosina, sal 5-trifosfato tetrasódico, uridín-5-trifosfato (UTP), hidrocloreto de fenilefrina y L-NAME metil éster,  $\alpha$ - $\beta$  metilén ATP, Ach, L-fenilefrina hidrocloreto, clotrimazol, endotelina, indometacina (todos de Sigma, St Louis, Mo, USA), ODYA (ácido 17-octadecinoico, de Cayman Chemical), 2-metil ATP (RBI, Natick, Mass, USA), nitroprusiato sódico y cloruro de bario (Merck, Darmstadt, Germany).

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las curvas D-R en presencia ó ausencia de los inhibidores (L-NAME, incremento de K<sup>+</sup> e indometacina) se compararon usando 3 factores al azar (ratas, dosis y tratamiento). Cuando los resultados del análisis de la varianza fueron significativos se aplicó el test de Tukey y Newman Keuls (Snedecor and Cochran 1980).

Los datos se expresaron como medias  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas se evaluaron por un análisis randomizado de la varianza y el test de Newman-Keuls. Las diferencias significativas fueron indicadas por probabilidad  $< 0.05$ .

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Tablas

**Tabla I.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a ATP, 2-metiltoATP y UTP en riñón aislado y perfundido control y tratado con L-NAME o K<sup>+</sup>.

n=5-7	DE50 (log mol/g riñón)	Respuesta máxima (% PPR)
<i>ATP</i>		
Control	-8.60 ± 0.17	-49.3 ± 4.2
L-NAME	-8.85 ± 0.09	-18.9 ± 1.4**
K <sup>+</sup>	-8.75 ± 0.20	-30.2 ± 2.6**
L-NAME+K <sup>+</sup>	-8.80 ± 0.15	3.02 ± 0.8***
<i>2-metiltoATP</i>		
Control	-10.7 ± 0.07	-60.1 ± 1.7
L-NAME	-10.6 ± 0.10	-23.8 ± 2.0***
K <sup>+</sup>	-10.7 ± 0.18	-24.1 ± 0.5***
L-NAME+K <sup>+</sup>	-10.7 ± 0.08	-2.85 ± 0.6***
<i>UTP</i>		
Control	-9.63 ± 0.05	-61.9 ± 2.5
L-NAME	-9.58 ± 0.10	-28.6 ± 1.8***
K <sup>+</sup>	-9.62 ± 0.17	-27.4 ± 3.1 ***
L-NAME+K <sup>+</sup>	-9.60 ± 0.15	-9.23 ± 1.2***

Valores expresados como media ± error estándar. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 *versus* control.



**Tabla II:** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP, fenilefrina y cloruro de bario en riñón aislado y perfundido de ratas Wistar Kyoto (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

n=5-7	DE50 (-log g/g riñón)	Respuesta máxima (mmHg)
<i><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-metilénATP</i>		
WKY	6.20 $\pm$ 0.22	115 $\pm$ 4.2
SHR	6.70 $\pm$ 0.13*	178 $\pm$ 5.3**
<i>Fenilefrina</i>		
WKY	6.15 $\pm$ 0.08	212 $\pm$ 17
SHR	6.21 $\pm$ 0.10	260 $\pm$ 12.0*
<i>Cloruro de bario</i>		
WKY	2.73 $\pm$ 0.05	182 $\pm$ 5.2
SHR	2.78 $\pm$ 0.10	236 $\pm$ 8.1**

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus WKY.

**Tabla III.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a 2-metiltilioATP, acetilcolina y nitroprusiato sódico en riñón aislado y perfundido de ratas Wistar Kyoto (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

n=5-7	DE50 (-log g/g riñón)	Respuesta máxima (% PPR)
<i>2-metiltilioATP</i>		
WKY	8.62 ± 0.32	-56.3 ± 3.8
SHR	8.70 ± 0.23	-57.8 ± 5.0
<i>Acetilcolina</i>		
WKY	7.85 ± 0.22	-59.6 ± 7.2
SHR	7.91 ± 0.10	-71 ± 12
<i>Nitroprusiato sódico</i>		
WKY	6.93 ± 0.15	-44.0 ± 5.2
SHR	7.48 ± 0.18	<b>-58.3 ± 8.1*</b>

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05 *versus* WKY.

**Tabla IV.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP, fenilefrina y cloruro de bario en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia de 90 minutos (ISQ-90) y sometido a una isquemia de 90 minutos seguida de 2 horas de reperfusión (I90-R120).

n=5-7	DE50 (log g/g riñón)	Respuesta máxima (mmHg)
<i><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-metilénATP</i>		
CONT	-7.12 $\pm$ 0.03	67.1 $\pm$ 7.1
ISQ-90	-7.02 $\pm$ 0.07	51.2 $\pm$ 9.0
I90-R120	-6.68 $\pm$ 0.04**	45.2 $\pm$ 6.8*
<i>Fenilefrina</i>		
CONT	-6.06 $\pm$ 0.04	198 $\pm$ 11
ISQ-90	-5.94 $\pm$ 0.05	185 $\pm$ 13
I90-R120	-5.80 $\pm$ 0.04*	215 $\pm$ 16
<i>Cloruro de bario</i>		
CONT	-2.43 $\pm$ 0.03	177 $\pm$ 12
ISQ-90	-2.28 $\pm$ 0.06*	105 $\pm$ 22**
I90-R120	-2.40 $\pm$ 0.03	68 $\pm$ 5.2***

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 *versus* control.

**Tabla V.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP, fenilefrina y cloruro de bario en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia unilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusión (I90-24U) y sometido a una isquemia bilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusión (I90-24B).

n=5-7	DE50 (log g/g riñón)	Respuesta máxima (mmHg)
<i><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-metilénATP</i>		
CONT	-7.02 $\pm$ 0.03	117 $\pm$ 9.1
I90-24U	-6.80 $\pm$ 0.04*	90 $\pm$ 6.8*
I90-24B	-6.82 $\pm$ 0.05*	120 $\pm$ 8.8
<i>Fenilefrina</i>		
CONT	-6.35 $\pm$ 0.06	208 $\pm$ 17
I90-24U	-6.24 $\pm$ 0.03	225 $\pm$ 18
I90-24B	-6.30 $\pm$ 0.04	218 $\pm$ 12
<i>Cloruro de bario</i>		
CONT	-2.75 $\pm$ 0.01	180 $\pm$ 11
I90-24U	-2.43 $\pm$ 0.02*	132 $\pm$ 10*
I90-24B	-2.71 $\pm$ 0.02	162 $\pm$ 14

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 *versus* control.

**Tabla VI.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a 2-metiltioATP, UTP y acetilcolina en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia de 90 minutos (ISQ-90) y sometido a una isquemia de 90 minutos seguida de 2 horas de reperusión (I90-R120).

n=5-7	DE50 (log g/g riñón)	Respuesta máxima (% PPR)
<i>2-metiltioATP</i>		
CONT	-7.89 ± 0.15	-42.0 ± 7.8
ISQ-90	-8.00 ± 0.18	-28.5 ± 3.6
I90-R120	-8.01 ± 0.12	-59.1 ± 1.7
<i>UTP</i>		
CONT	-6.93 ± 0.08	-43.8 ± 8.1
ISQ-90	-6.91 ± 0.05	-25.0 ± 8.8
I90-R120	-6.91 ± 0.002	-59.4 ± 2.7
<i>Acetilcolina</i>		
CONT	-7.37 ± 0.20	-46.3 ± 1.9
ISQ-90	-7.75 ± 0.18	-38.1 ± 2.8
I90-R120	-7.43 ± 0.04	-61.4 ± 6.8

Valores expresados como media ± error estándar.

**Tabla VII.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a 2-metiltilioATP, UTP y acetilcolina en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia unilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusión (I90-24U) y sometido a una isquemia bilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusión (I90-24B).

n=5-7	DE50 (log g/g riñón)	Respuesta máxima (% PPR)
<i>2-metiltilioATP</i>		
CONT	-7.93 ± 0.12	-43.4 ± 5.8
I90-24U	-7.98 ± 0.14	-45.8 ± 4.7
I90-24B	-8.10 ± 0.14	-48.3 ± 3.8
<i>UTP</i>		
CONT	-6.92 ± 0.11	-38.3 ± 2.6
I90-24U	-7.25 ± 0.18	-43.8 ± 2.9
I90-24B	-7.30 ± 0.20	-57.6 ± 3.2*
<i>Acetilcolina</i>		
CONT	-7.39 ± 0.13	-51.7 ± 3.8
I90-24U	-7.64 ± 0.12	-54.9 ± 4.5
I90-24B	-8.00 ± 0.20	-62 ± 5.8

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05 versus control.

**Tabla VIII.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP, endotelina y peróxido de hidrógeno en riñón aislado y perfundido control y tratado con ODYA.

n=5-7	DE50	Respuesta máxima (mmHg)
$\square$ , $\square$ -metilénATP (log M/g riñón)		
CONT	-7.25 $\pm$ 0.25	65.6 $\pm$ 6.7
ODYA	-7.21 $\pm$ 0.30	61.3 $\pm$ 6.8
<i>Endotelina</i> (log g/g riñón)		
CONT	-6.70 $\pm$ 0.20	187 $\pm$ 17
ODYA	-6.75 $\pm$ 0.18	132 $\pm$ 18
$H_2O_2$ ( $\mu$ l)		
CONT	6.42 $\pm$ 0.25	143 $\pm$ 12
ODYA	6.40 $\pm$ 0.15	138 $\pm$ 13

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar.

**Tabla IX.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a 2-metiltioATP y acetilcolina en riñón aislado y perfundido control y tratado con clotrimazol.

n=5-7	DE50 (log g / g de riñón)	Respuesta máxima (mmHg)
<i>2-metiltioATP</i>		
CONT	-7.71 ± 0.2	-59.2 ± 6.4
Clotrimazol	-8.30 ± 0.3	-28.6 ± 4.3*
<i>Acetilcolina</i>		
CONT	-7.72 ± 0.3	-66.2 ± 4.1
Clotrimazol	-7.51 ± 0.2	-39.0 ± 3.3*

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05 versus control.



**Tabla X.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilenATP, endotelina y peróxido de hidrógeno en riñón aislado y perfundido de ratas macho y ratas hembra.

n=5-7	DE50	Respuesta máxima (mmHg)
$\square$ , $\square$ -metilénATP (log M/g riñón)		
Machos	-7.21 $\pm$ 0.25	60.6 $\pm$ 4.7
Hembras	-7.07 $\pm$ 0.20	43.3 $\pm$ 3.8*
<i>Endotelina</i> (log g/g riñón)		
Machos	-6.72 $\pm$ 0.21	177 $\pm$ 14
Hembras	-6.76 $\pm$ 0.10	112 $\pm$ 9.2*
$H_2O_2$ ( $\mu$ l)		
Machos	6.38 $\pm$ 0.25	142 $\pm$ 10
Hembras	7.40 $\pm$ 0.15*	132 $\pm$ 11

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 *versus* ratas macho.

**Tabla XI.** Dosis eficaz 50 (DE50) y respuesta máxima a 2-metiltioATP y acetilcolina en riñón aislado y perfundido de ratas macho y ratas hembra.

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar.

n=5-7	DE50 (log g / g de riñón)	Respuesta máxima (mmHg)
<i>2-metiltioATP</i>		
Machos	-7.71 $\pm$ 0.2	-58.2 $\pm$ 6.0
Hembras	-8.02 $\pm$ 0.3	-48.6 $\pm$ 4.3
<i>Acetilcolina</i>		
Machos	-7.72 $\pm$ 0.3	-68.2 $\pm$ 4.6
Hembras	-7.31 $\pm$ 0.2	-62.0 $\pm$ 5.3

## 5.2 GRÁFICAS Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS.

### 5.2.1 .Resultados sobre mediadores endoteliales en la respuesta purinérgica.

La figura 1 refleja los efectos del L-NAME en las curvas D-R a ATP, 2-metilatioATP y UTP, que disminuye significativamente las respuestas a todos los agonistas. Las curvas D-R a todos los agonistas también estaban atenuadas de forma importante por el  $K^+$  a altas concentraciones (fig 1 y tabla I). La administración simultánea de L-NAME y  $K^+$  suprimía de forma dosis-dependiente la disminución de la PPR producida por ATP, 2-metilatioATP y UTP. La administración de inhibidores de la síntesis de PGs como la indometacina no atenuó la curva D-R a cualquiera de los agonistas de los  $P_2Y$  purinorreceptores.

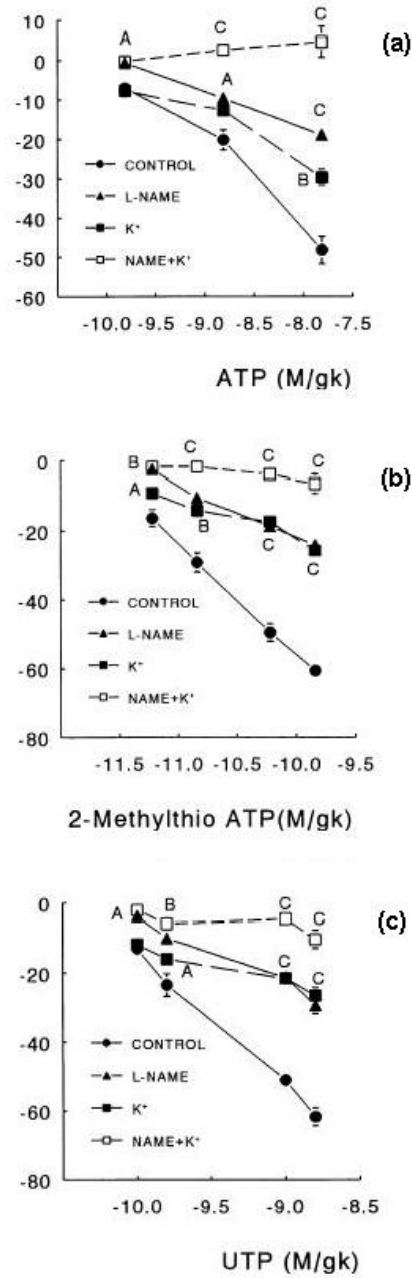
### 5.2.2. Resultados sobre la contribución purinérgica a la hipertensión espontánea en ratas.

Las ratas fueron divididas en dos grupos, WKY (control) y SHR (hipertensas), todas ellas con una edad de 5 meses. A esta edad, las ratas SHR tenían una tensión arterial más alta que el grupo de WKY (WKY=132±4, SHR=187,6±3 mmHg:  $p<0.001$ ), medida mediante pletismografía.

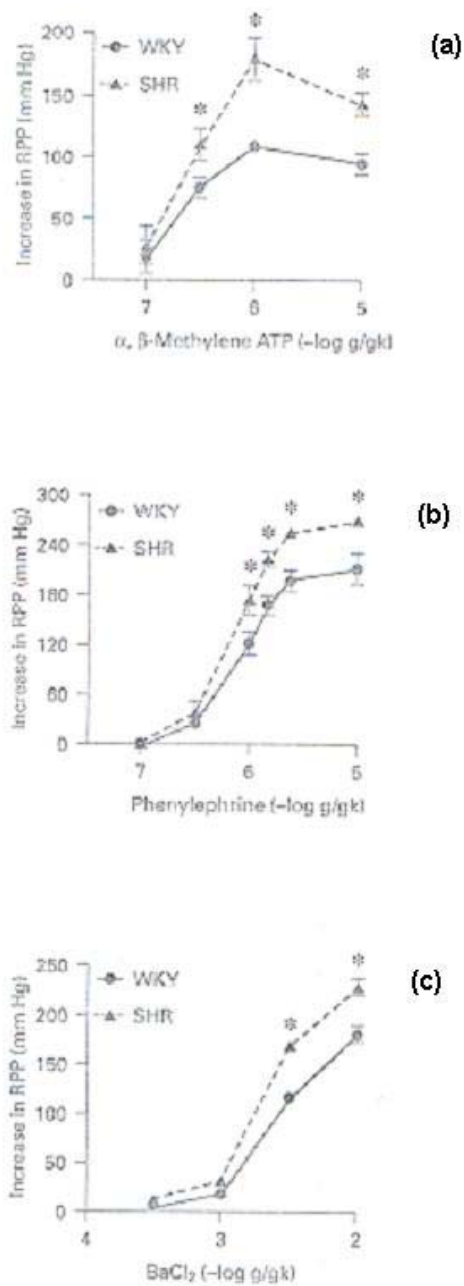
No había una diferencia significativa en la resistencia vascular entre los riñones de SHR y los de WKY, puesto que la PPR basal era similar en ambos grupos (WKY=45±4, SHR=47±3 mmHg).

Los vasos renales de las ratas SHR demostraron una reactividad aumentada a  $\alpha,\beta$ -metilénATP, Phe y cloruro de bario (fig.2 y tabla II). Las curvas D-R tuvieron un umbral similar con una mayor respuesta máxima, por lo que las curvas se desviaron a la izquierda de forma no paralela.

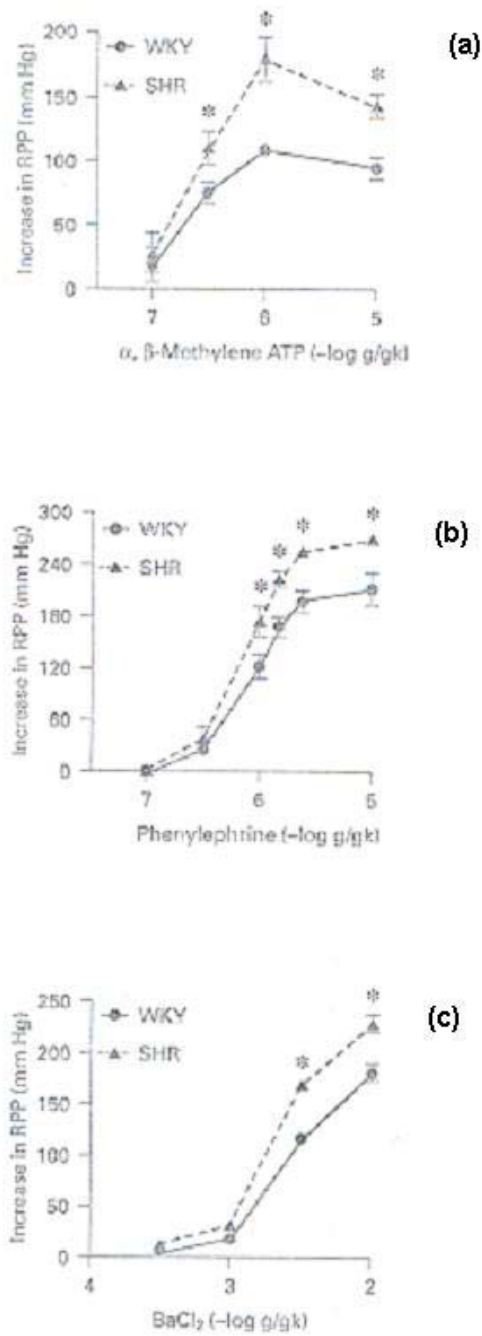
En riñones de WKY y SHR, la administración de dosis en forma de bolus de 2-metilatioATP, Ach o NP produjo una disminución relativa de la PPR en los riñones preconstrañidos con Phe (fig.3 y tabla III) sin diferencias significativas en las curvas de D-R o en la vasodilatación máxima cuando se compararon ambos grupos, excepto en la dosis de 10-6 g/gk de NP en las que el grupo de ratas SHR mostró una respuesta aumentada.



**Figura 1.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de ATP (a), 2-metiltioATP (b) y UTP (c) en riñón aislado y perfundido control y tratado con L-NAME, K<sup>+</sup> o L-NAME + K<sup>+</sup>. A (p<0.05 versus control). B (p<0.01 versus control). C (p<0.01 versus control).



**Figura 2.** Aumento en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de  $\alpha, \beta$ -metilenoATP (a), fenilefrina (b) y cloruro de bario (c) en riñón aislado y perfundido de ratas Wistar Kyoto (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). \*  $p < 0.05$  versus WKY.



**Figura 3.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de 2-metil ATP (a), acetilcolina (b) y nitroprusiato (c) en riñón aislado y perfundido de ratas Wistar Kyoto (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). \*  $p < 0.05$  versus WKY.

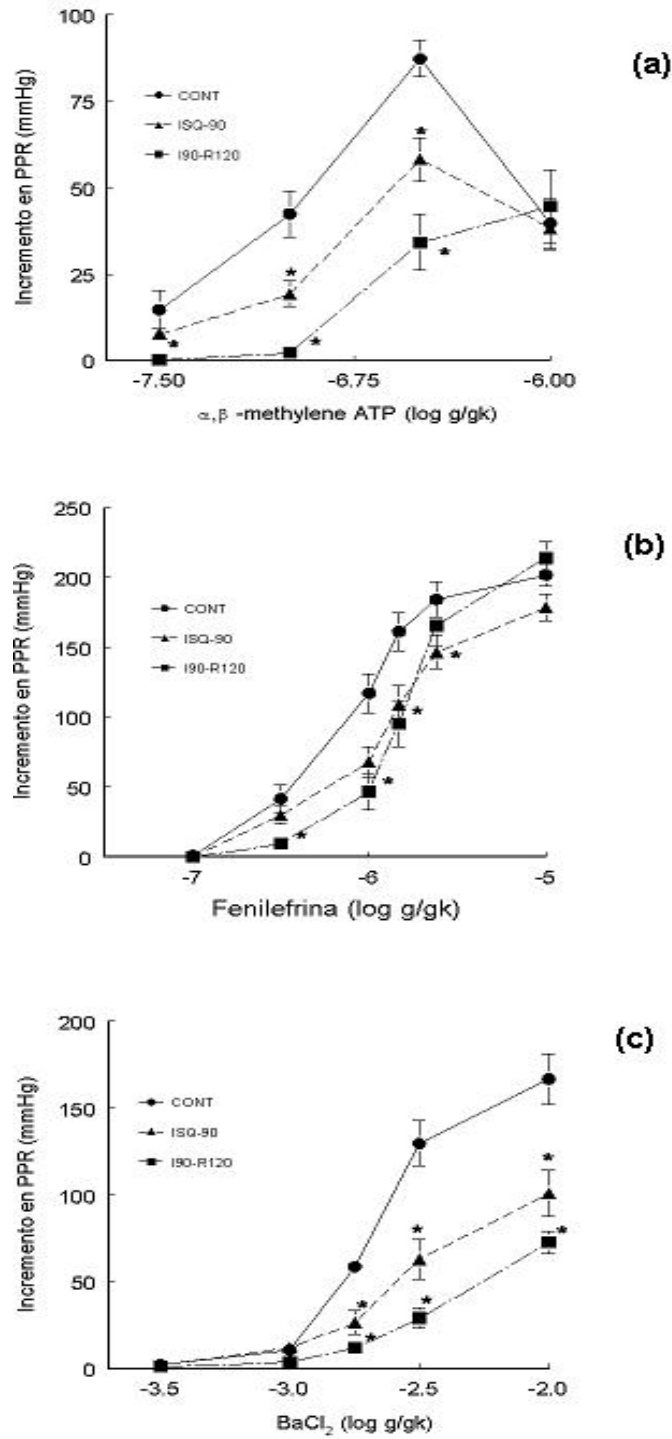
### **5.2.3 Resultados sobre reactividad vascular renal purinérgica tras un proceso de isquemia-reperusión.**

#### **5.2.3.1 Respuesta a vasoconstrictores**

La isquemia de 90 min produce una marcada atenuación de la respuesta al agonista P2X-purinérgico,  $\alpha,\beta$ -metilén ATP, que fue significativo en todos los puntos excepto en el último después de haberse obtenido la respuesta máxima. En la curva dosis respuesta también se produjo un desplazamiento a la derecha encontrándose diferencias en los puntos centrales de la curva. La reactividad a Cl<sub>2</sub>Ba se vió igualmente atenuada con un marcado descenso en la respuesta máxima.

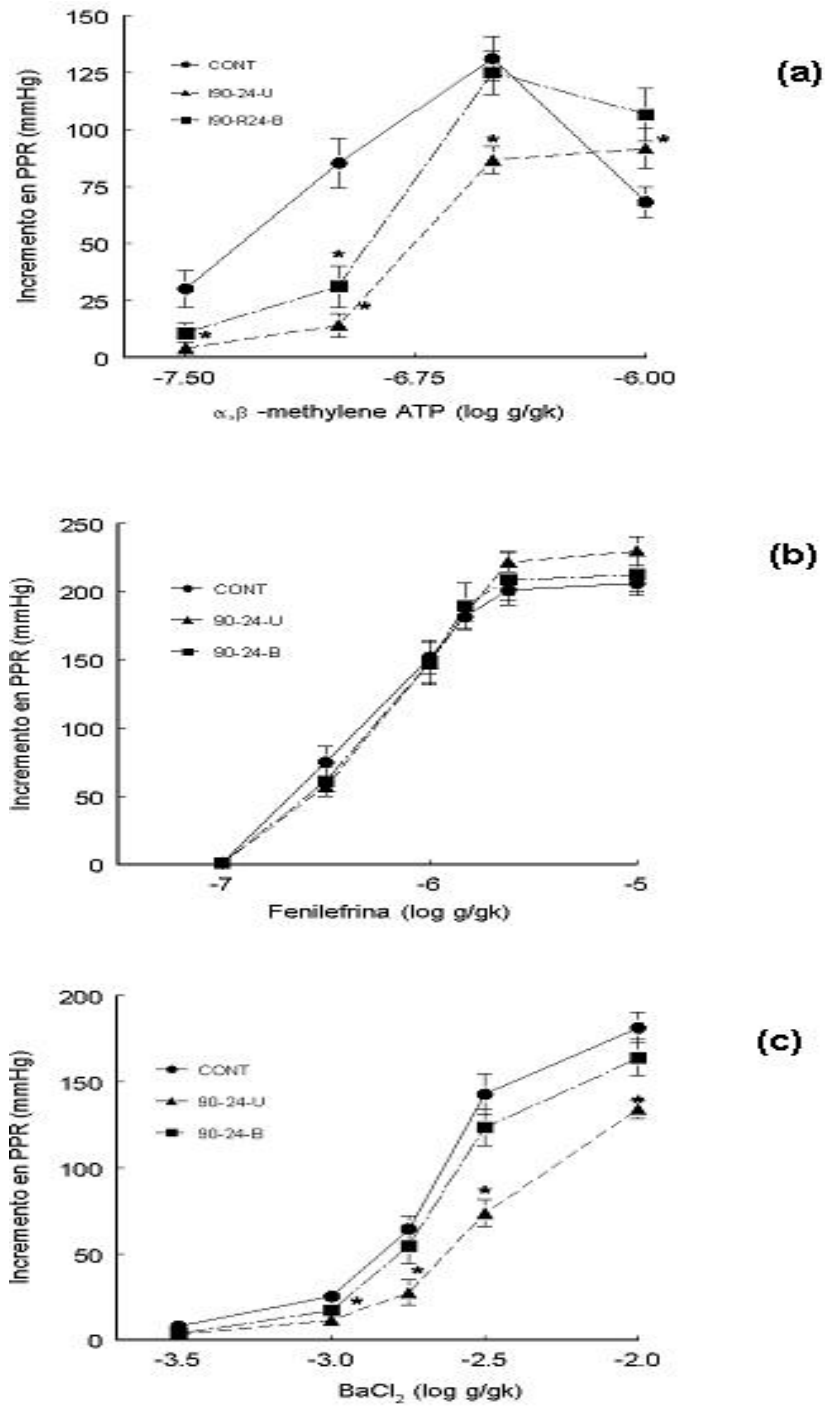
La reperusión de 120 min tras los 90 de isquemia produjo un desplazamiento a la derecha aún mayor, que el producido por la isquemia, en las curvas dosis respuesta de los tres agonistas vasoconstrictores (Fig.4 y tabla IV).

La respuesta a  $\alpha,\beta$ -metilén ATP permaneció severamente atenuada tras 24 h de reperusión. La curva dosis respuesta a Cl<sub>2</sub>Ba también se encontró reducida mientras que la de Phe fue similar a la observada en los riñones controles. Cuando la isquemia había sido bilateral la reperusión solamente atenuó la curva dosis respuesta a  $\alpha,\beta$ -metilénATP, mientras que las curvas dosis-respuesta de los otros dos agonistas estudiados fenilefrina y Cl<sub>2</sub>Ba no se modificaron significativamente ( Fig.5 y tabla V).



**Figura 4.** Aumento en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilenoATP (a), fenilefrina (b) y cloruro de bario (c) en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia de 90 minutos (ISQ-90) y sometido a una isquemia de 90 minutos seguida de 2 horas de reperusión (I90-R120). \*  $p < 0.05$  versus control.

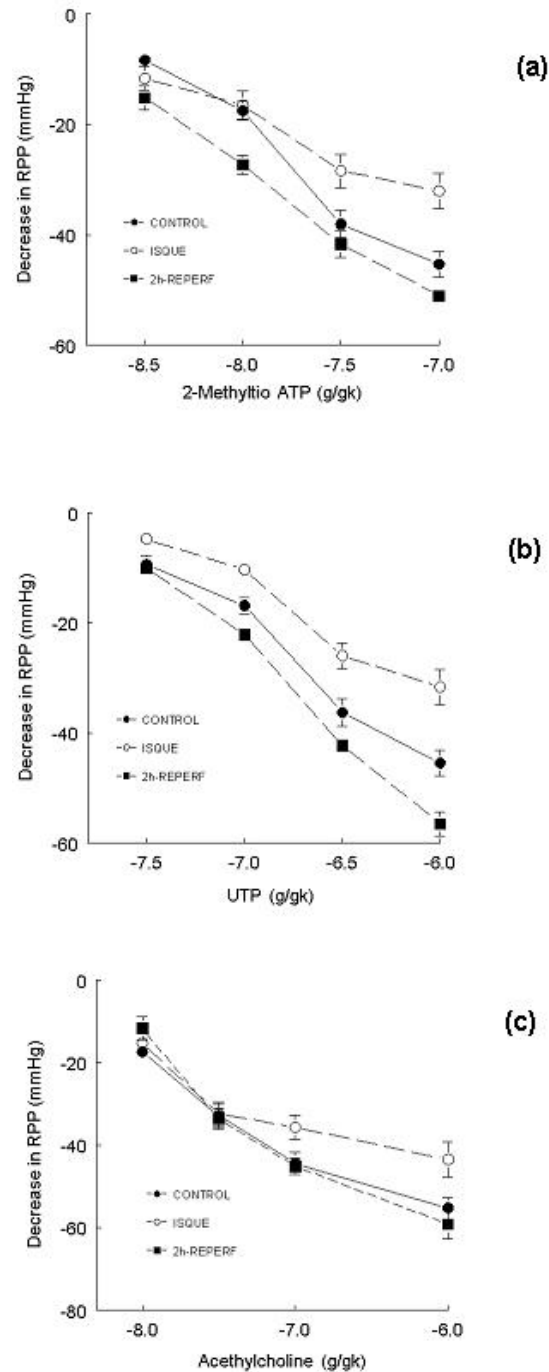




**Figura 5.** Aumento en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de  $\alpha, \beta$ -metilenoATP (a), fenilefrina (b) y cloruro de bario (c) en riñón aislado y perfundido control (CONT), sometido a un período de isquemia unilateral de 90 minutos seguido de 24 horas de reperfusión (90-24-U) y sometido a una isquemia bilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusión (90-24-B). \*  $p < 0.05$  versus control.

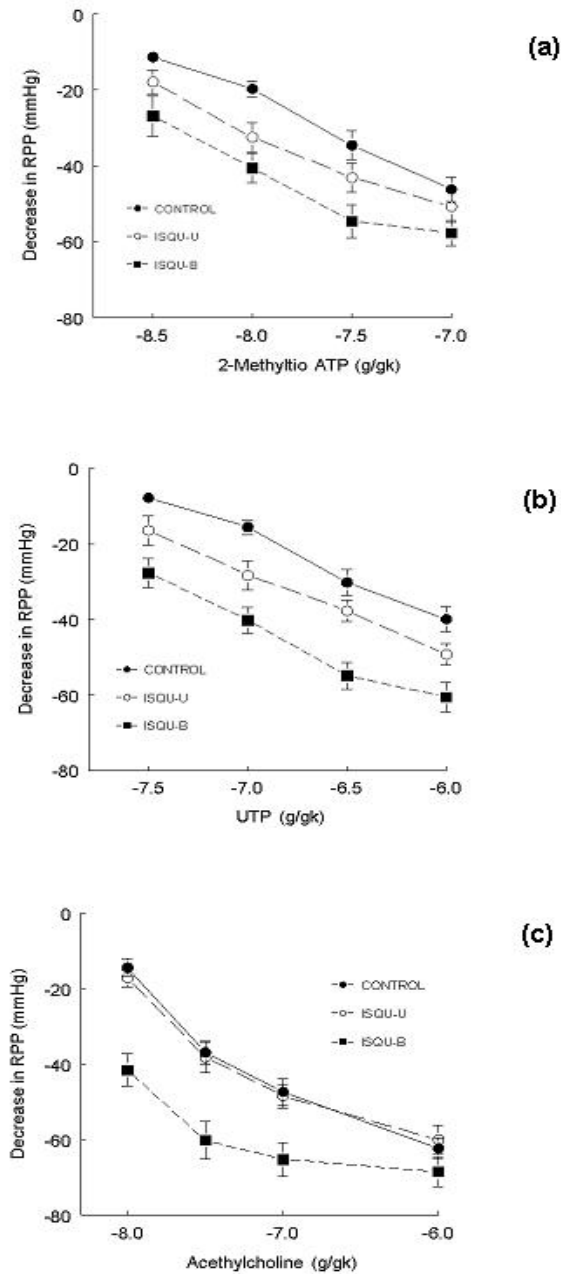
### 5.2.3.2 Respuesta a vasodilatadores

Los 90 min de isquemia produjeron una disminución significativa en la respuesta vasodilatadora máxima a la Ach, 2-metiltilio ATP y UTP. Después de 90 min de isquemia y 2h de reperfusión se observó una normalización de la respuesta a los tres agonistas (Fig.6 y tabla VI).



**Figura 6.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de 2-metiltilioATP (a), UTP (b) y acetilcolina (c) en riñón aislado y perfundido control (CONTROL), sometido a un período de isquemia de 90 minutos (ISQUE) y sometido a una isquemia de 90 minutos seguida de 2 horas de reperfusión (2h-REPERF).

Después de 90 min de isquemia y 24h de reperfusion la repuesta a los tres agonistas fue también similar a la encontrada en los riñones controles. Cuando la isquemia fue bilateral la respuesta a los tres agonistas se encontró marcadamente incrementada tras 24h de reperfusion (Fig.7 y tabla VII).

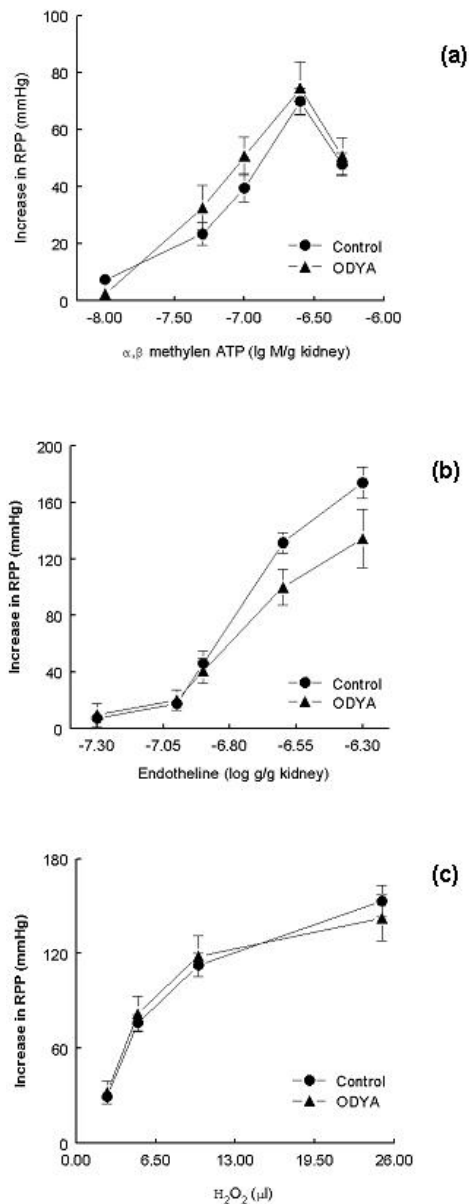


**Figura 7.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de 2-metilthioATP (a), UTP (b) y acetilcolina (c) en riñón aislado y perfundido control (CONTROL), sometido a un período de isquemia unilateral de 90 minutos seguido de 24 horas de reperfusion (ISQU-U) y sometido a una isquemia bilateral de 90 minutos seguida de 24 horas de reperfusion (ISQU-B).

## 5.2.4 Resultado sobre el papel de los derivados de citocromo P450 en la reactividad vascular renal purinérgica.

### 5.2.4.1 Respuesta a vasoconstrictores

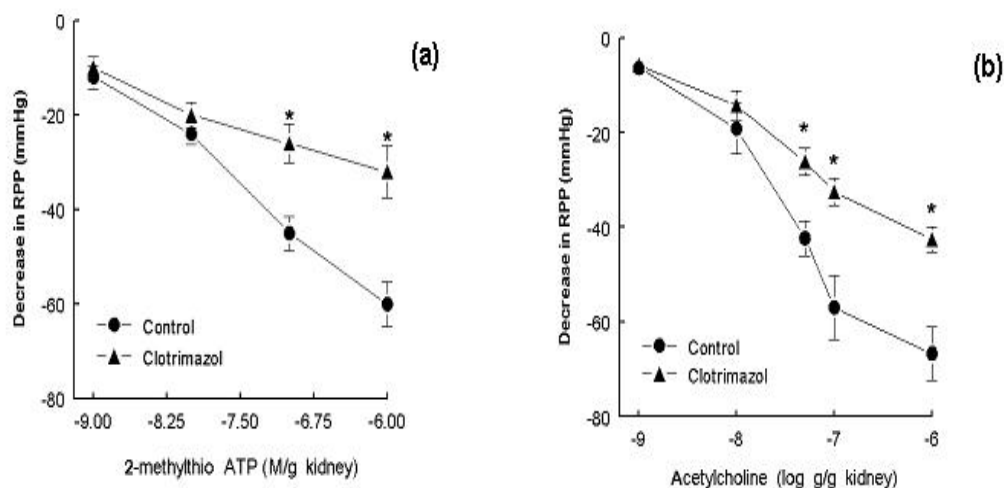
La administración de HT0016, inhibidor específico del 20-HETE, no modificó significativamente las curvas dosis respuesta a  $\alpha$ - $\beta$  metilén ATP, endotelina o  $H_2O_2$  (Fig.8 y tabla VIII) en el riñón aislado y perfundido de rata.



**Figura 8.** Aumento en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilénATP (a), endotelina (b) y peróxido de hidrógeno (c) en riñón aislado y perfundido control y tratado con ODYA.

### 5.2.4.2 Respuesta a vasodilatadores

La administración de clotrimazol (10<sup>-5</sup> M), inhibidor de la síntesis de 5,6 EET, produjo una marcada reducción en la acción vasodilatadora del 2-metiltioATP y de la Ach, afectando a ambos agonistas de una forma similar (Fig.9 y tabla IX).



**Figura 9.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de 2-metilthioATP (a), y acetilcolina (b) en riñón aislado y perfundido control y tratado con clotrimazol. \* p<0.05 versus control.

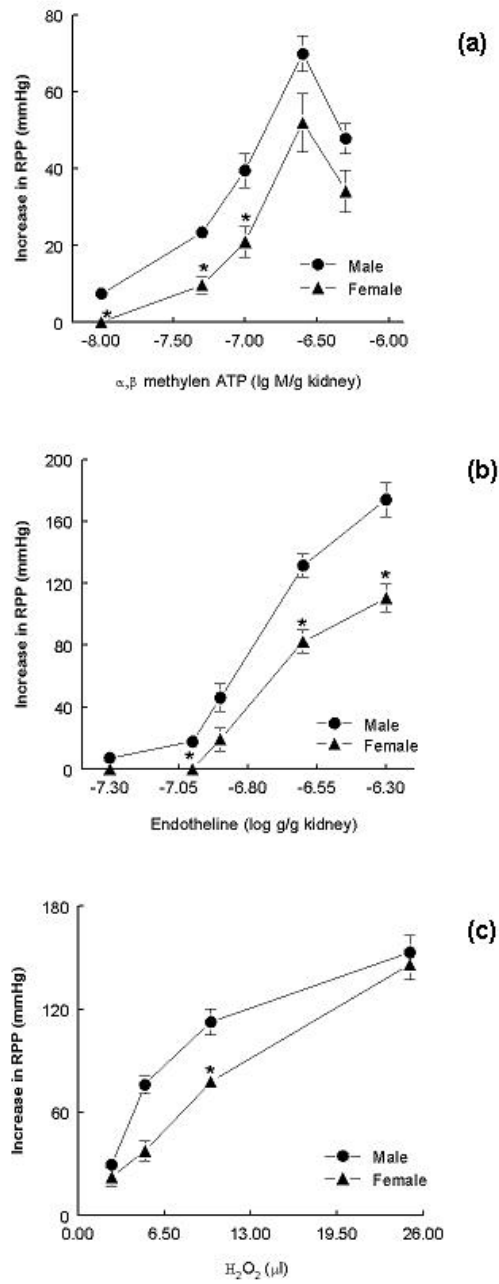
### 5.2.5 Resultados sobre diferencias en la respuesta purinérgica en función del género.

#### 5.2.5.1 Respuesta a vasoconstrictores

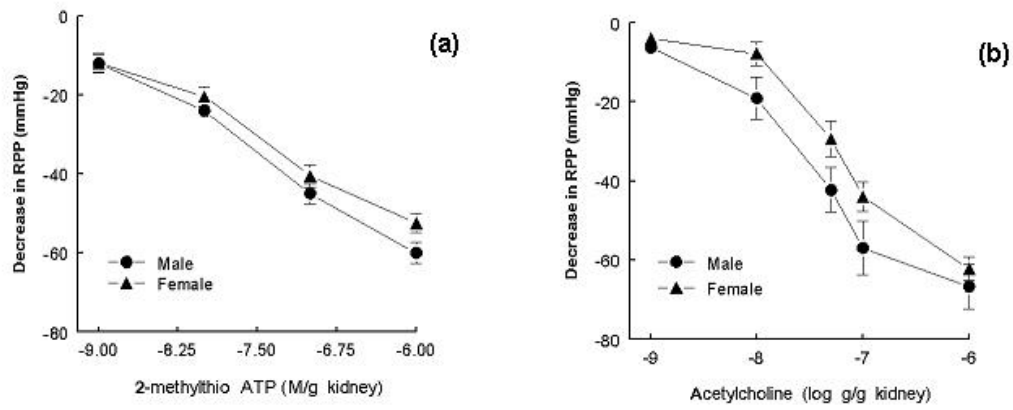
En ratas hembra, se encontraba disminuida la reactividad vascular a vasoconstrictores  $\alpha$ , $\beta$ -metilénATP, endotelina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La curva estaba desplazada hacia la derecha con una disminución en las respuestas a concentraciones intermedias. Se observó también un marcado descenso en la respuesta máxima a la endotelina (Fig.10 y tabla X).

#### 5.2.5.2 Respuesta a vasodilatadores

En experimentos en riñón aislado y perfundido de ratas macho y ratas hembra, tras la precontractión con Phe, y la administración de bolus de 2M-S-ATP o de Ach se producía en ambos grupos de ratas una disminución de la PPR dosis-dependiente (Fig.11 y tabla XI) Además, los riñones de ratas macho y hembra muestran una respuesta similar a 2M-S-ATP o Ach, lo que nos determina que no existen diferencias de género en los mecanismos de vasodilatación.



**Figura 10.** Aumento en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilenoATP (a), endotelina (b) y peróxido de hidrógeno (c) en riñón aislado y perfundido de ratas macho y ratas hembra. \*  $p < 0.05$  versus ratas macho.



**Figura 11.** Porcentaje de disminución en la presión de perfusión renal en respuesta a concentraciones crecientes de 2-metilthioATP (a), y acetilcolina (b) en riñón aislado y perfundido de ratas macho y ratas hembra.

## **6. DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSION

### 6.1 CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES VASODILATADORES DERIVADOS DEL ENDOTELIO A LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LOS P2Y PURINORRECEPTORES EN EL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA.

Este estudio muestra que partes de la vasculatura renal comparadas con otras redes vasculares tienen la capacidad de dilatarse en respuesta a la activación de los dos P2y purinorreceptores. Nuestros datos están de acuerdo en parte con descubrimientos de Churchill y Ellis (1993) quienes estudiaron la respuesta a la activación de los P2y1 purinorreceptores con el agonista específico 2-metilatioATP y con los estudios de Eltze y Ullrich (1996) que determinaron la respuesta a los diferentes agonistas de los P2 purinorreceptores en el riñón aislado y perfundido.

Uno de los principales hallazgos de esta tesis doctoral es que el FHDE juega un papel importante en los efectos vasodilatadores de los agonistas de los purinorreceptores P2y1 y P2y2 en la red vascular renal. Nuestros resultados indican que en la respuesta vasodilatadora de los agonistas de los P2y purinorreceptores están involucrados el FHDE y NO pero no los mediadores de vasodilatación derivados de la ciclooxigenasa.

La administración de dosis de  $10^{-4}$  M de L-NAME inhibía de forma marcada la vasodilatación renal inducida por ATP, 2 metilatioATP y UTP (Fig. 1). Sin embargo hay un importante componente vasodilatador resistente a L-NAME. La inhibición parcial de la vasodilatación inducida por todos los agonistas de los purinorreceptores P2y en el lecho vascular renal está en consonancia con los datos publicados previamente por Churchill y Ellis (1993) sobre la estimulación del purinorreceptor P2y1 en esta misma preparación.

Sin embargo, esto contrasta con la inhibición completa producida por el L-NAME en la respuesta del 2-metilatioATP en riñón aislado y perfundido (Eltze y Ullrich 1996). Las discrepancias con la publicación de Eltze y Ullrich 1996 se puede deber a diferencias en el protocolo experimental, desde que estos autores usaron una perfusión a alto flujo ( $17,9 \pm 1.9$  ml / min), lo cual es un importante estímulo para la producción de NO (Vargas y Osuna 1996) a través de mecanismos de estrés por rozamiento. También se ha observado una completa inhibición en la respuesta del 2-metilatioATP producida por L-NAME en segmentos de arteria principal del conejo. (Rump et al 1998).Nuestras discrepancias con esta publicación se podría deber a que la arteria principal es un conducto vascular donde el NO es el único factor vasodilatador derivado del endotelio. Se ha demostrado que el papel del NO en la vasodilatación inducida por los purinorreceptores disminuye a lo largo del árbol cerebrovascular en la rata, donde el papel del FHDE adquiere cada vez más importancia (You et al 1999).

La importancia del FHDE en los efectos vasodilatadores de los agonistas dependientes del endotelio ha sido puesta de manifiesto por muchos autores (Feletou y Vanhoutte 1999; Garland et al 1995; Monbouli and Vanhoutte 1997; Quilley et al 1997).

Los efectos del FHDE en la fibra muscular lisa se deben a la apertura de los canales de K<sup>+</sup>, pero el subtipo exacto de canal que está involucrado no se conoce bien y puede variar entre las distintas especies (Feletou y Vanhoutte 1999). Por lo tanto, para evaluar la actividad de este factor, usamos el incremento extracelular de K<sup>+</sup> como bloqueador no específico de los canales de K<sup>+</sup>. Incrementando el K<sup>+</sup> extracelular se ha definido una importante inhibición de la vasodilatación dependiente del endotelio en la vasculatura renal (Vargas et al 1994). Este estudio muestra que el potasio alto sólo o administrado con el L-NAME influye marcadamente en la vasodilatación inducida por el ATP, 2-metil ATP y UTP, indicando que el FHDE juega un papel importante en la vasodilatación renal inducida por los P2y1 y P2y2 purinorreceptores. Además nuestros datos indican que los efectos vasodilatadores de los P2y agonistas pueden ser explicados por la actividad simultánea del NO y EDHF. Estos datos están en sintonía con los publicados por Malmsjo et al (2000) en la arteria mesentérica de ratas. Sin embargo la participación de ambos factores de relajación endotelial (NO y FHDE) en la vasodilatación inducida por P2y1 en la vasculatura renal contrasta con la participación exclusiva del NO en arterias cerebrales (Marelli et al 1999, You et al 1997) sugiriendo que existen diferencias entre las redes vasculares estudiadas. La participación de ambos mediadores NO y EDHF en la respuesta a la estimulación del purinorreceptor P2y2 en la vasculatura renal concuerda con los descubrimientos en la arteria cerebral de las ratas (Marelli et al 1999, You et al 1997).

Es conocido que el ATP y otros agonistas dependientes del endotelio estimulan la liberación de PGI<sub>2</sub> y otras PGs, (Fulton et al 1992; Koller et al 1989; Needham et al 1987; Pearson et al 1983) lo cual contribuye a la vasodilatación inducida por los purinorreceptores P2y.

La administración de ATP estimula la producción de PGs en células endoteliales de una manera dosis-dependiente, con regreso a los valores de base después de 5-6 min (Pearson et al 1983)

Nosotros desarrollamos nuestra curva D-R con dosis bolus de agonistas como el estímulo apropiado para la producción de PGs. Sin embargo nuestro experimento mostró que la administración de indometacina a dosis de 10<sup>-5</sup> M que produce una inhibición del 90% de estas sustancias en el riñón aislado de rata (Bhardwaj and Moore 1988), pero no inhibía la curva D-R a ninguno de los agonistas purinérgicos (Fig. 2).

Nuestro estudio no evidenció una posible contribución de las PGs como mediadores derivados del endotelio que provoquen estimulación de los purinorreceptores p2y. En este contexto, algunos estudios han llegado a la conclusión de que los efectos vasodilatadores de los

agonistas de los purinorreceptores P2y (Eltze y Ullrich 1996; Vargas et al 1996) y otros agonistas dependientes del endotelio (Fulton et al 1992) no diferían en la ausencia o presencia de inhibidores de la síntesis de PGs (indometacina) determinando que las PGs no juegan un papel importante en la vasodilatación dependiente del endotelio.

Nuestros resultados sugieren que el NO es responsable aproximadamente del 50% de la respuesta vasodilatadora para los agonistas P2y1 y P2y2 en la vasculatura renal y que el resto del efecto vasodilatador se debe a la actividad de EDHF. Nuestros datos indican que las PGs no juegan un papel importante en la respuesta vasodilatadora que hay como consecuencia de la estimulación de los purinorreceptores P2y en la red vascular renal de la rata.

## **6.2 LA REACTIVIDAD RENAL VASCULAR MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS P2-PURINORRECEPTORES EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.**

La reactividad de los agonistas purinérgicos P2 se evaluó en el riñón aislado y perfundido de ratas SHR, una red vascular completa que comprende pequeñas arterias resistentes y arteriolas, las cuales son fisiológicamente más relevantes que los vasos conductores para el control de la resistencia vascular y la presión sanguínea. Para analizar la reactividad de los agonistas purinérgicos P2x también examinamos otras sustancias vasoconstrictoras mediadas por receptor Phe y otros estimulantes musculares no específicos (BaCl<sub>2</sub>), para determinar si las alteraciones en la reactividad vascular se restringieron a un agonista específico o implicaron la maquinaria contráctil. El riñón procedente de las SHR mostró un aumento en la reactividad al  $\alpha,\beta$ -metilénATP. Estos resultados pueden sugerir que la hipertensión espontánea está acompañada por un aumento de la actividad del receptor p2x. Sin embargo, el hecho de que la vasculatura renal SHR mostrara una marcada reacción a todos los agonistas indica que es un mecanismo no específico. Este aumento de la reactividad vascular a los vasoconstrictores puede ser debido a un cambio estructural morfológico en la resistencia de los vasos, como se indica por la ausencia de diferencias en la PPR basal, y puede jugar un papel en el mantenimiento de la presión arterial elevada en estos animales. Este fenómeno ha sido muy bien definido en hipertensión experimental y un cambio morfológico puro causó un cambio no paralelo de la curva dosis-respuesta y afectó a la respuesta de todos los agonistas del mismo grado.

La reactividad purinérgica P2y se analizó midiendo la respuesta de vasodilatación al agonista específico 2-metil tio ATP en relación con las respuestas de la Ach, el agonista endotelio dependiente generalmente más usado y NP, un vasodilatador no dependiente del endotelio. La respuesta vasodilatadora al 2-metil tio ATP fue similar en el riñón procedente de ratas SHR y WKY. Estos datos son consistentes con los hallazgos de Koga et al. en tiras aórticas aisladas de machos mayores (SHR de 12 a 25 meses). La respuesta purinérgica P2y en riñones aislados y perfundidos está casi completamente bloqueada por la administración de L-

NAME, que inhibe la síntesis de NO. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la vasodilatación NO dependiente se preserva bien en SHR.

Los riñones aislados de las ratas SHR y WKY mostraban una respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (Ach) y a los vasodilatadores independientes (NP). Estos resultados coinciden con aquellos previamente informados por otros autores en la misma preparación. Aunque varios estudios han mostrado una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por la Ach en las grandes arterias aisladas se han obtenido resultados contradictorios en vasos humanos resistentes, además, los datos relatados en esta publicación junto con hallazgos similares narrados en vasos resistentes procedentes de ratas hipertensas contradicen las hipótesis de que la presión por sí sola disminuye la reactividad vascular mediada por el endotelio. Esta respuesta al nitroprusiato, no decreció en SHR, indicando que no hay defecto en el mecanismo mediado por cGMP. En este sentido, se han encontrado niveles inapropiadamente normales de cGMP en las arterias mesentéricas de ratas SHR, mientras que la síntesis de NO estaba aumentada.

Saumento de la respuesta al alfa, beta metilen ATP. Estos resultados pueden sugerir un aumento de la actividad renal P<sub>2x</sub> purinorreceptores en estas ratas aunque esta alteración puede ser secundaria a los cambios morfológicos (hipertrofia arterial) de la red vascular renal. La respuesta al 2-metil ATP, Ach y NP fue similares en los WKY y en las SHR, indicando que la vasodilatación mediada por NO y el mecanismo vasodilatador dependiente de cGMP están también preservados en ratas SHR.

### **6.3 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y REACTIVIDAD VASCULAR RENAL PURINÉRGICA**

Los nucleótidos de purinas y pirimidinas tienen propiedades vasoactivas en la circulación renal. Los resultados de los experimentos anteriores demuestran que pueden tener un efecto dual (vasoconstricción ó vasodilatación), dependiendo del tipo de receptor sobre el que actúen. Se produce vasoconstricción si se activan los P<sub>2x</sub>-purinorreceptores y vasodilatación si se activan los P<sub>2Y1</sub> y P<sub>2Y2</sub>-purinorreceptores que se encuentran localizados en las células vasculares endoteliales.

#### **6.3.1 reactividad p<sub>2x</sub>-purinérgica en isquemia-reperfusión**

Los resultados obtenidos en este apartado indican que la isquemia de 90 min y la perfusión de 120 min producen un marcado descenso de la respuesta al agonista P<sub>2x</sub>-purinérgico y de los otros agonistas vasoconstrictores ensayados, actuando a través de receptor de membrana o estimulantes directos de la maquinaria contráctil. La atenuación en la respuesta vasoconstrictora se mantiene excepto para fenilefrina cuando la perfusión es de 24 h. Sin embargo si se encontró una

atenuada repuesta purinérgica específica tras 24 h de reperfusión cuando la isquemia renal fue bilateral.

Nuestros resultados contrastan con la idea generalizada de que la isquemia-reperfusión se asocia a un aumento de reactividad a los agentes vasoconstrictores (Conger et al, 1995). En consonancia con nuestros datos, (Pruneau et al, 1993) estudiando anillos aislados de arteria renal encuentran que las curvas dosis-respuesta para KCl, NA, 5-HT, y AII, no estaban alteradas después de la isquemia-reperfusión. Igualmente, (Mik'ó I ,1997) encuentra que el clampage atraumático de las arterias renales durante 60 min produce un descenso irreversible de la contractilidad a noradrenalina, incluso si se hace hipotermia o se administra tratamiento antioxidante simultáneamente. Sin embargo, otros estudios (Verbeke et al ,1996) observaron que la vasoconstricción inducida por la serotonina en los lechos vasculares renales estaba aumentada después de la isquemia en el animal intacto. Se ha observado (Chen CF et al, 1996) que en el lecho vascular mesentérico de rata hay una marcada reducción en la respuesta a fenilefrina tras 40 min de isquemia y 5 h de reperfusión.

Los estudios en isquemia-reperfusión en la circulación coronaria, en contraposición con los encontrados de forma mayoritaria en la vasculatura renal, parecen indicar que en este lecho vascular la isquemia-reperfusión está seguida por un aumento en la respuesta a los agentes presores.

Así, VanBenthuyzen KM, 1987 observa que la reperfusión después de la oclusión aguda coronaria en perros aumenta la reactividad contráctil in vitro. En la misma línea, Yang BC et al (1993), observan que la oclusión coronaria subtotal en perros seguida de reperfusión aumenta la respuesta vasoconstrictora a un análogo del tromboxano A<sub>2</sub>.

En la circulación cerebral Mayhan et al, 1988 encuentran que después de 10 min de isquemia global y una hora de reperfusión, la respuesta vasoconstrictora a angiotensina II y serotonina no estaba alterada en los vasos cerebrales. En resumen, la isquemia reperfusión produce una atenuación en la respuesta a los agentes vasoconstrictores en el lecho vascular renal y el hecho de que el proceso sea generalizado indica que puede ser secundario a una disminución en el funcionamiento de la maquinaria contráctil que puede ser generado por diversos factores como: déficit de ATP, generación de radicales libres o excesiva producción de NO y por tanto, no hay una afectación purinérgica específica. En este sentido, diversos estudios (Chen CF et al, 2006) han observado que la reducida respuesta a Phe en el lecho vascular mesentérico producida por isquemia-reperfusión se corregía mediante el bloqueo de la síntesis de NO. Finalmente es interesante destacar que en los diferentes protocolos estudiados, excepto en la isquemia bilateral y reperfusión de 24 h, no se ha observado que la isquemia-reperfusión produzca alteraciones específicas de la reactividad P<sub>2X</sub>-purinérgica.

### 6.3.2 Reactividad P<sub>2Y</sub>-purinérgica en isquemia-reperfusión

El NO es una molécula que juega un papel importante en la homeostasis normal y en los procesos patológicos. Está bastante claro su papel en los procesos fisiológicos. Sin embargo el papel que juega en la isquemia-reperfusión es materia de controversia. En este estudio se analizó la respuesta P<sub>2Y</sub> purinérgica y la respuesta a Ach para tratar de observar si la isquemia-reperfusión produce disfunción endotelial inespecífica o selectiva dependiendo del receptor implicado.

Los hallazgos más relevantes del efecto de la isquemia y de la isquemia-reperfusión en la respuesta a los agonistas purinérgicos fueron: la isquemia de 90 min produce un marcado descenso en la respuesta vasodilatadora máxima a los dos agonistas purinérgicos (P<sub>2X1</sub> y P<sub>2X2</sub>) así como en la molécula de referencia como vasodilatador endotelio dependiente Ach. Después de 90 min de isquemia y 2h de perfusión se observó una normalización de la respuesta a los tres agonistas; lo mismo ocurrió después de 90 min de isquemia y 24h de perfusión, circunstancias en las que la repuesta a los tres agonistas fue similar a la encontrada en los riñones controles. Sin embargo, cuando la isquemia fue bilateral la respuesta a los tres agonistas se encontró marcadamente incrementada tras 24h de perfusión.

La atenuada reactividad a vasodilatadores tras la isquemia, al ser generalizada sugiere que puede ser debida a un déficit energético generado por el déficit de aporte de oxígeno durante los 90 min sin aporte sanguíneo. No hemos encontrado protocolos similares en la bibliografía para contrastar estos datos.

En nuestro estudio la isquemia-reperfusión no atenúa la respuesta vasodilatadora de todos los agonistas estudiados indicando que este proceso en la vasculatura renal no se acompaña de anomalías en la función endotelial. Incluso cuando la isquemia es bilateral se produce un marcado incremento en la respuesta a los vasodilatadores también de forma inespecífica.

Nuestros datos contrastan con los descritos por Marelli et al en MCA (arteria cerebral media) tras 2h de isquemia y 24 h de perfusión donde observan que la isquemia-reperfusión disminuye la vasodilatación mediada por P<sub>2Y1</sub> receptores, inducida por el agonista selectivo 2MeS-ATP y aumenta la vasodilatación mediada por P<sub>2Y2</sub> receptores, a través del agonista selectivo UTP, este último a través del EDHF como componente de la vasodilatación. Así pues, los efectos tras 2 horas de isquemia y 24 horas de perfusión en la vasodilatación inducida por el endotelio, fue dependiente del sistema de receptores sobre el que se actuó. También se ha observado disminución en la vasodilatación mediada a través de los receptores- P<sub>2Y1</sub> tras el mecanismo de isquemia perfusión en las arterias coronarias. En estos estudios, la oclusión /perfusión de las arterias coronarias provocaba una disminución en la vasodilatación al ADP (un agonista a P<sub>2Y1</sub> receptores). Durante al menos 48 horas en un estudio (Horwitz, L.D et al, 1994) y 12 semanas en otro estudio (Pearson, P.J et al ,1990).

Las diferencias encontradas en reactividad purinérgica y a otros agentes endotelio-dependientes entre los diferentes tejidos, indica que la respuesta endotelial y vascular a la isquemia-reperfusión no es un fenómeno generalizado, sino que depende de la sensibilidad del lecho vascular que estemos considerando.

#### **6.4 PAPEL DE LOS DERIVADOS DEL CYP-450 EN LA ACCIÓN DE LOS AGONISTAS PURINÉRGICOS EN LA VASCULATURA RENAL.**

Los productos de la omega-hidroxilación del ácido araquidónico por el citocromo CYP 450, especialmente el 20-HETE, se han considerado componentes esenciales de la señal de transducción activada por numerosos agentes vasoactivos, como la endotelina (Oyekan y McGiff, 1998) y la angiotensina (Croft et al., 2000), que tienen papeles centrales en la regulación de la presión sanguínea (McGiff y Quilley, 1999). En este sentido, se ha propuesto (Roman et al, 2000 ) que el 20 HETE actuaría como un segundo mensajero universal para inducir la acción vasoconstrictora en los diferentes lechos vasculares y tras la administración de cualquier agonista. Sin embargo, nuestros resultados claramente muestran que la administración de HT0016 (dosis), inhibidor específico de 20-HETE, no modificó significativamente las curvas dosis respuesta a  $\alpha$ - $\beta$  metilénATP, endotelina o  $H_2O_2$  en el riñón aislado y perfundido de rata.

Los EETs especialmente el 5,6 EET se ha identificado como el FHDE liberado en arterias coronarias y renales en humanos y otras especies ya que presenta características similares a los metabolitos del ácido araquidónico derivados de la acción del CYP2C endoteliales. Estas sustancias provocan la hiperpolarización del endotelio y el músculo liso vascular activando canales de  $K^+$  calcio-dependientes (Campbell et al., 1996) así como bombas de  $Na^+$ - $K^+$  (Pratt et al., 2001).

La vascularización renal parece verse modificada especialmente por la actividad del CYP. Aunque los inhibidores clásicos de CYP no producen prácticamente alteración en la sensibilidad vascular (en ausencia de inhibidores de NO sintasa y ciclooxigenasa), en la mayoría de estudios el aumento de la respuesta arteriolar aferente frente a la presión transmural está marcadamente afectado por la inhibición de la CYP epoxigenasa.

Nuestro estudio demuestra que la administración de clotrimazol ( $10^{-5}$  M), inhibidor de la síntesis de 5,6 EET, produjo una marcada reducción en la acción vasodilatadora del 2M-S-ATP y de la Ach, afectando a ambos agonistas de una forma similar. Estos resultados indican que estos derivados juegan un importante papel en la vasodilatación inducida por el agonista P2Y y de la vasodilatación endotelio dependiente en general.

Estos datos están en consonancia con la contribución que tiene el FHDE a la acción vasodilatadora de los agonistas P2Y-purinérgicos, como se describe en otro apartado de la tesis y ACh previamente observado por nuestro grupo en la misma preparación empleada en el presente

estudio (Vargas et al, 1994) .De estas observaciones se podría inferir que los EETs podrían actuar como el factor hiperpolarizante ya que su contribución a la acción vasodilatadora endotelio-dependiente en el lecho vascular renal es similar.

### 6.5 REACTIVIDAD P<sub>2</sub>-PURINÉRGICA EN MACHOS Y HEMBRAS

La vasculatura renal de las ratas hembra, muestran una reducción significativa a la respuesta de  $\alpha,\beta$ -metilénATP, endotelina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados indican que no hay ninguna diferencia específica en cuanto a reactividad P<sub>2X</sub>-purinérgica entre machos y hembras. Además, estos resultados están en consonancia con un trabajo previo de nuestro laboratorio, realizado en la misma preparación, donde encontramos que las respuestas vasculares a Phe y AII están disminuidas en ratas hembra respecto a ratas macho ( Wangensteen et al, 2004).

La disminución en la reactividad vascular a vasoconstrictores en ratas hembra puede deberse a un aumento de la producción/liberación de los factores relajantes derivados del endotelio en respuesta a dichos vasoconstrictores. En este sentido, se ha podido observar ( Wangensteen et al, 2004) que la neutralización ( en ratas hembra ) del endotelio así como el bloqueo simultáneo del NO y del EDHF determina que no existan diferencias de género. Los riñones de ratas macho y hembra tienen una respuesta similar a 2MeS-ATP ó Ach , lo que nos indica que no hay diferencias significativas de género en las curvas dosis-respuesta a vasodilatadores, indicando por lo tanto, que no hay alteraciones específicas de reactividad P<sub>2Y</sub>-purinérgica.



## **7. CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados sugieren que el NO es responsable aproximadamente del 50% de la respuesta vasodilatadora para los agonistas P2y1 y P2y2 en la vasculatura renal y que el resto del efecto vasodilatador se debe a la actividad de FHDE. Las PGS no juegan ningún papel en dicha respuesta vasodilatadora.

2. Nuestros resultados también indican que los riñones de las ratas SHR muestran un aumento de la respuesta al  $\alpha,\beta$ -metilén ATP y a los otros vasoconstrictores utilizados. Esta alteración puede ser secundaria a los cambios morfológicos de la red vascular renal. La vasodilatación inducida por el NO y el mecanismo vasodilatador dependiente de cGMP están preservados en las ratas SHR.

3. La isquemia produce una importante disfunción endotelial y como consecuencia una respuesta reducida a la estimulación P2Y-purinérgica. El proceso de I-R renal no produce disfunción endotelial ni alteraciones específicas de los P2Y-purinorreceptores en la vasculatura renal. La isquemia bilateral seguida de 24h de reperfusión determina una hiperrespuesta endotelial y P2Y-purinérgica, posiblemente a consecuencia de un estado de circulación hiperdinámica.

4. El 20-HETE, no parece contribuir a la acción presora de los agentes vasoconstrictores que actúan en la vasculatura renal ya sea a través de receptor o de forma directa sobre la maquinaria contráctil. Sin embargo, si parece jugar un papel importante el 5,6EET en la acción de los vasodilatadores endotelio dependientes en los vasos renales, actuando probablemente como un factor hiperpolarizante derivado del endotelio.

5. No hemos encontrado evidencias de que existan diferencias de género que afecten de forma específica a la actividad P2-purinérgica ni en los agonistas de los receptores P2X (vasoconstricción) ni P2Y (vasodilatación).

El aumento de reactividad vascular renal P2X-purinérgica en consonancia con los demás agentes vasoconstrictores en ratas macho puede contribuir al dimorfismo sexual de presión arterial en la rata.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994;**64**(3):445-75.
- Abbracchio MP, Cattabeni F, Fredholm BB, Williams M. Purinoceptor nomenclature: A status report. *Drug dev Res.* 1993; **28**:207-213.
- Adeagbo AS, Triggle CR. Varying extracellular [K<sup>+</sup>]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993 Mar;**21**(3):423-9.
- Altura, B.M. Sex as a factor influencing the responsiveness of arterioles to catecholamines. *Eur. J. Pharmacol.* 1972;**20**:261-265.
- Alvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J Biol Chem.* 1992;**267**:11789-11793.
- Ashton N, Balment RJ. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991 Jan;**124**(1):91-7.
- Aso Y, Tajima A, Suzuki K, Ohmi Y, Kanbayashi T, Mitsuhashi T, Ikeda K: Intraoperative blood pressure control by ATP in pheochromocytoma. *Urology* 1986;**6**:512-520.
- Belhassen B, Pelleg A. Acute management of paroxysmal supraventricular tachycardia: verapamil, adenosine triphosphate or adenosine? *Am J Cardiol.* 1984 Jul 1;**54**(1):225-7.
- Bhardwaj R, Moore PK. Endothelium-derived relaxing factor and the effects of acetylcholine and histamine on resistance blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988 Nov;**95**(3):835-43.
- Bhargava, K.P., Dhawan, K.N., Saxena, R.C. Enhancement of noradrenaline pressor responses in testosterone-treated cats. *Br. J. Pharmacol.* 1967; **31**: 26-31.
- Boarini DJ, Kassell NF, Sprowell JA, Olin JJ, Coester HC: Adenosine triphosphate-induced arterial hypotension in the dog. *Neurosurgery* 1984;**15**:325-331.
- Bo XN, Burnstock G. The effects of Bay K 8644 and nifedipine on the responses of rat urinary bladder to electrical field stimulation, beta,gamma-methylene ATP and acetylcholine. *Br J Pharmacol.* 1990 Oct;**101**(2):494-8.
- Burnstock G. Physiological and pathological roles of purines: an update. *Drug Dev Res* 1993;**28**:195-206
- Burnstock G. Plasticity in expression of co-transmitters and autonomic nerves in aging and disease. *Adv Exp Med Biol.* 1991;**296**:291-301.

Burnstock G, Cocks T, Crowe R, Kasakov L. Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 1978 May; **63**(1):125-38. Burnstock G, Dumsday B, Smythe A. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol.* 1972 Mar; **44**(3):451-61.

Burnstock G, Fischer B, Hoyle C, Maillard M, Ziganshin A, Brizzolara AL, von Isakovics, Boyer JL, Kendall-Harden T, Jacobson KA. Structure activity relationships for derivatives of adenosine-5-triphosphate as agonists at P<sub>2</sub> purinoceptors: Heterogeneity within P<sub>2x</sub> and P<sub>2y</sub> subtypes. *Drug Dev Res* 1994; **31**: 206-219.

Burnstock G, Kennedy C: A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. *Cir Res* 1985; **58**:319-330.

Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor?. *Gen Pharmacol.* 1985; **16**(5):433-40.

Burnstock G, Kennedy C: Purinergic receptors in the cardiovascular system. *Progr Pharmacol* 1986; **6**:111-132.

Burnstock G: Vascular control by purines with emphasis on the coronary system. *Eur Heart J* 1989; **10**(suppl F ):15-21.

Campbell WB and Gauthier KM. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors ? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; **11**:177-183.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996; **78**:415-423.

Chen, Y.F. Sexual dimorphism of hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1996; **6**:181-185.

Chen J-K, Wang D-W, Falck JR, Capdevila J, Harris RC. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular messenger in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1999; **274**:4764-4769.

Churchill PC, Ellis VR. Pharmacological characterization of the renovascular P<sub>2</sub> purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Apr; **265**(1):334-8.

Churchill PC, Ellis VR. Purinergic P<sub>2y</sub> receptors stimulate renin secretion by rat renal cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Jul; **266**(1):160-3.

Clarke II, Boucher RC. Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. *Am J Physiol.* 1992 Aug; **263**(2 Pt 1): C348-56.

Colby HD, Brownie AC. A comparison of the effects produced by metyrapone and its reduced metabolite on adrenal 11-beta-hydroxylase system in the rat. *Steroids.* 1970 Oct; **16**(4):401-13.

Colby HD, Skelton FR, Brownie AC. Testosterone-induced hypertension in the rat. *Endocrinology.* 1970 May; **86**(5):1093-101.

- Collis, M.G., Vanhoutte, P.M. Vascular reactivity in isolated perfused kidneys from male and female spontaneously hypertensive rats. *Cir. Res.* 1977; **41**: 759-767
- Cornfield LJ, Hu S, Hurt SD, Sills MA. [3H]2-phenylaminoadenosine ([3H]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Nov; **263**(2):552-61.
- Conger JD, Hammond WS. Renal vasculature and ischemic injury. *Ren Fail* 1992; **14**:307-10.
- Conger JD, Robinette JB, Hammond WS. Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1991 Jun; **39** (6):1087-97.
- Conger JD ,Weil JV. Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investing Med* 1995; **43**:431-42.
- Conger JD , Weil JV. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in post-ischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1995; **96**:631-8.
- Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Maestroni GJ, Conti A, Rasini E, Lecchini S, Frigo G. Association between the circadian course of endogenous noradrenaline and the hematopoietic cell cycle in mouse bone marrow. *J Chemother.* 1998 Apr; **10**(2):179-81.
- Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest.* 1998 Apr 1; **101**(7):1530-7.
- Cosentino F, Sill JC, Katusiá ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1994 Feb; **23**(2):229-35.
- Cristol JP, Thiermermann C, Mitchell JA, Walder C. Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and ciclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br. J Pharmacol* 1993; **109**:188-94.
- Crofton JT, Share L, Brooks DP. Gonadectomy abolishes the sexual dimorphism in DOC-salt hypertension in the rat. *Clin Exp Hypertens A.* 1989; **11**(7):1249-61.
- Croft KD, McGiff JC, Sanchez-Mendoza A, Carroll MA. Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; **279**:544-551.
- Cusack NJ, Hourani SM. Competitive inhibition by adenosine 5'-triphosphate of the actions on human platelets of 2-chloroadenosine 5'-diphosphate, 2-azidoadenosine 5'-diphosphate and 2-methylthioadenosine 5'-diphosphate. *Br J Pharmacol.* 1982 Oct; **77**(2):329-33.
- Daly JW. Adenosine receptors: targets for future drugs. *J Med Chem.* 1982 Mar; **25**(3):197-207.

- Daval JL, Nehlig A, Nicolas F. Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci.* 1991;**49**(20):1435-53.
- Eltze, M. and Ullrich, B. Characterization of vascular P<sub>2</sub> purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 1996;**306**: pp. 139–152.
- Feletou M, Vanhoutte PM. The alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan;**31**(1):15-22.
- Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, Fleming I. Nifedipine increases cytochrome P450C expression and EDHF-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension.* 2000;**36**:270-275.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 1999;**401**:493-497.
- Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase(Cytochrome P450 2C9 ) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res.* 2001;**88**:44-51.
- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25;**267**(27):19443-7.
- Forrester T, Harper AM, MacKenzie ET, Thompson EM: Effect of adenosine triphosphate and some derivatives on cerebral blood flow and metabolism. *J Physiol (Lond)* 1979;**296**:343-355.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994 Jun;**46**(2):143-56.
- Fulton, D., Mcgiff, J.C. and Quilley, J. Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 1992;**107**: pp. 722–725.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;**288**(5789):373-6.
- Garland JC, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *TIPS* **16**:23-30, 1995.
- Hecker M. Endothelium-derived hiperpolarizin factor-Fact or Fiction? *News Physiol Sci* **15**:1-5,2000.
- Horwitz, L.D., D. Kaufman, M. W. Keller, and Y.Kong. Time course of coronary endothelial healing after injury due to ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994; **90**:2439-2447.
- Imig JD, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin. *J Vas Res.* 2001; **38**:247-255.

- Ishii, K., Chang, B., Kerwin Jr., J.F., Huang, Z.J. and Murad, F. *N<sup>w</sup>*-Nitro--arginine. A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;**176**: pp. 219–223.
- Jacobson KA, van Galen PJ, Williams M. Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem.* 1992 Feb 7;**35**(3):407-22.
- Kauser, K., Rubanyi, G.M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. *Am. J. Physiol.*1994; **267**:H2311-H2317.
- Kennedy C, Burnstock G: Evidence for two types of P2-purinoceptor in the longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 1985;**111**:49-56.
- Kiernan JA: Action of adenosine 5'triphosphate on mast cells in normal and denervated skin. *Arch Dermatol Forsch* 1974;**251**:83-86.
- Kim KC, Zheng QX, Van-Seuningen I. Involvement of a signal transduction mechanism in ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 ; **8** (2):121-5.
- Koller, A., Messina, E.J., Wolin, M.S. and Kaley, G. Endothelial impairment inhibits prostaglandin and EDRF-mediated arteriolar dilation in vivo. *Am. J. Physiol.* 1989;**257**,pp. H1966–H1970.
- Kristal OA, Marchenko SM, Obukhov AG: Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurones. *Neuroscience* 1988;**27**:995-1000.
- Lachmann B, Gommers D. Is it rational to treat pneumonia with exogenous surfactant? *Eur Respir J.* 1993 Nov;**6**(10):1427-8.
- Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol.* 1993 Feb;**264**(2 Pt 2):F344-7.
- Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García-Estañ J, Ruilope LM. Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am J Hypertens.* 1997 Jan;**10**(1):129-40.
- Lahera V, Khraibi AA, Romero JC. Sulfhydryl group donors potentiate the hypotensive effect of acetylcholine in rats. *Hypertension.* 1993 Aug;**22**(2):156-60.
- Li D, Belusa R, Nowicki S, Aperia A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase are age dependent. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;**278**:823-829.
- Li P-L, Chen C-L, Bortell R, Campbell WB. 11,12-Epoyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP – ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circ Res.* 1999;**85**:349-356.
- Li, Z., Duckles, S.P. Influence of gender on vascular reactivity in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*1994; **268**: 1426-1431.



Lieberthal W, Wolf EF, Rennk HG, Valeri CR. Ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Physiol* 1989; **256**: 894-900.

Liu, M.Y., Hattori, Y., Fukao, M., Sato, A., Sakuma, I., Kanno, M. Alteration in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br. J. Pharmacol.* 2001; **132**: 1035-1046.

Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 May; **77**(5):2551-4.

López B, Moreno C, Salom MG, Roman RJ, Fenoy FJ. Role of guanydyl cyclase and cytochrome P-450 on renal response to nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; **281**:420-427.

Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension.* 1990 May; **15**(5):482-5.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986 Apr; **8**(4):344-8.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1986 Jun; **8**(6 Pt 2):II55-60. Erratum in: *Hypertension* 1987 Apr; **9**(4):421.

Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens.* 2002 Jun; **20**(6):1135-42.

Magnuson MO. Renal vascular response to vasodilators following warm ischemia and cold storage preservation in dog kidneys. *J Urol* 1993 Jan; **149** (1):186-9.

Maier KG, Roman RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; **10**:81-87.

Malmjsjo M, Edvinsson L, Erlinge D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. *Eur J Pharmacol.* 2000 Feb 25; **390**(1-2):173-80.

Mályusz M, Ehrens HJ, Wrigge P. Effect of castration on the experimental renal hypertension of the rat. Blood pressure, nephrosclerosis, long-chain fatty acids, and N-acetylation of PAH in the kidney. *Nephron.* 1985; **40**(1):96-9.

Masubuchi Y, Kumai T, Uematsu A, Komoriyama K, Hirai M. Gonadectomy-induced reduction of blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1982 Sep; **101**(1):154-60.

Marelli, S.P., Khorovets, A., Johnson, T.D., Childres, W.F. and Bryan Jr., R.M. P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated dilations in the rat middle cerebral artery after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol* 1999; **276**: pp. H33-H41.

Mayham, W.G., S.M. Amundsen, F.M. Faraci, and D.D. Heistad. Responses of cerebral arteries after ischemia and reperfusion in cats. *Am. J. Physiol* 1988; **255** ( Heart cir. Physiol. 24 ): H879-H884.

- McCormack DG, Barnes PJ, Evans TW: Purinoceptors in the pulmonary circulation of the rat and their role in hypoxic vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1989;**98**:367-372.
- McCormack DG, Crawley DE, Evans TW. New perspectives in the pulmonary circulation and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pulm Pharmacol*. 1993 Jun;**6**(2):97-108.
- McCulloch, A.I., Randall, M.D. Sex differences in the relative contribution of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium-dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br.J. Pharmacol*. 1998;**123**:1700-1706.
- McGiff JC, Quilley J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol*. 1999; **277**:607-623.
- Mik'ó I, Csabina S, Hauck M, Kov'acs J, Schmidt E, Pet'ó K, Furka I, Varga A, T'óth G. Protection of the renal artery in nephron-sparing surgery. Arterial contractility investns. *Acta Chir Hung* 1997;**36**:236-9.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jan;**31**(1):61-74.
- Mombouli, J.V., Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol. Sci*. 1997;**18**: 252-256.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM: Purinergic endothelium-dependent and independent contractions in rat aorta. *Hypertension* 1993; **22**:577-583.
- Morrow JD, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol*. 1996 Jan 12;**51**(1):1-9.
- Munger, K., Baylis, C. Sex differences in renal hemodynamics in rats. *Am. J. Physiol*.1988; **254**:F223-F231.
- Murgia M, Pizzo P, Zanovello P, Zambon A, Di Virgilio F. In vitro cytotoxic effects of extracellular ATP. *ATLA* 1992; **20**:66-70.
- Nava E, Farré AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Consentino F, Lüscher TF: Alterations in the nitric oxide pathway in the spontaneously hipertensive rats. *J Hypertens* 1998;**3**:385-391.
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;**88**(22):10045-8.
- Needham, L., Cusack, N.J., Pearson,J.D., Gordon, J. L. Characteristics of the P2 purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells. *Eur.J.Pharmacol*. 1987;**134**: 199-209.
- Noone PG, Knowles MR. Trends in therapy of abnormal airway epithelial ion and liquid transport. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1993;**48**(2):140-3.

- Olouglu C, Timlioglu O. Endothelium-dependent vasodilation in the isolated rabbit kidney following in vivo and in vitro ischaemia and reperfusion effects of antagonizing platelet activating factor ( PAF ). *J Cardiovas Pharmacol* 1991;**7**:313-5.
- Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990 Jul;**70**(3):761-845.
- Oyekan AO, McGiff JC. Functional response of the rat kidney to inhibition of nitric oxide synthesis: role of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *Br J Pharmacol.* 1998;**125**:1065-1073.
- Paddle BM, Burnstock G: Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilation. *Blood Vessels* 1976;**11**:110-119.
- Palea S, Artibani W, Ostardo E, Trist DG, Pietra C. Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *J Urol.* 1993 Dec;**150**(6):2007-12.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;**327**: pp. 524–526.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE : Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Eng J Med* 1990 ;**323** :22-27
- Pearson, J.D., Slakey, L.L., Gordon, J.L. Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells. *Biochem. J.* 1983; **214**: 273-276.
- Pearson, P.J., H.V. Schaff, and P.M. Vanhoutte. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ. Res.* 1990; **67**:385-393.
- Pearson, P.J., H.V. Schaff, and P.M. Vanhoutte. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990;**81**:1921-1927.
- Piana, R.N., S.Y.Wang, M. Friedman, and F.W. Sellke. Angiotensin-converting enzyme inhibition preserves endothelium-dependent coronary microvascular responses during short-term ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996;**93**:544-551.
- Pizzo P, Murgia M, Zambon A, Zanovello P, Bronte V, Pietrobon D, Di Virgilio F. Role of P2z purinergic receptors in ATP-mediated killing of tumor necrosis factor (TNF)-sensitive and TNF-resistant L929 fibroblasts. *J Immunol.* 1992 Nov 15;**149**(10):3372-8.
- Posposiello SI, Carroll MA, Falck JR, McGiff JC. Epoxyeicosatrienoic acid-mediated renal vasodilation to arachidonic acid is enhanced in SHR. *Hypertension.* 2001;**37**:887-893.
- Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Flemming I, Busse R. A transferable,  $\beta$ -naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesised by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol.* 1996; **497**:699-709.

Pratt PF, Li P, Hillard CJ, Kurian J, Campbell WB. Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;**280**:1113-1121.

Pruneau D, Belichard P. Endothelium-dependent control of vascular tone in the rabbit kidney after ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1993; **231**:215-21.

Quillen, J.E., F.W. Sellke, L.A. Brooks, and D.G. Harrison. Ischemia-reperfusion impairs endothelium-dependent relaxation of coronary microvessels but does not affect large arteries. *Circulation* 1990; **82**:586-594.

Quilley J, Fulton D, McGiff JC. Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol*. 1997 Nov 15;**54**(10):1059-70.

Radaelli A, Mircoli L, Mori I, Mancina G, Ferrari AU.

Nitric oxide dependent vasodilation in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998 Oct;**32**(4):735-9.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998 Sep;**50**(3):413-92.

Ralevic V, Burnstock G: Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 1991; **84**:1-14.

Ralevic V, Burnstock G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation*. 1991 Jul;**84**(1):1-14. Erratum in: *Circulation* 1991 Nov;**84**(5):2212.

Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992 Mar;**70**(3):593-9.

Rapaport E. Anticancer activities of adenine nucleotides in tumor bearing hosts. *Drug Dev Res* 1993 **28**:428-431.

Reckelhoff, J.F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;**37**: 1199-1208.

Reckelhoff JF, Hennington BS, Kanji V, Racusen LC, Schmidt AM, Yan SD, Morrow

J, Roberts LJ 2nd, Salahudeen AK. Chronic aminoguanidine attenuates renal dysfunction and injury in aging rats. *Am J Hypertens*. 1999 May;**12**(5):492-8.

Reckelhoff JF, Hennington BS, Moore AG, Blanchard EJ, Cameron J. Gender differences in the renal nitric oxide (NO) system: dissociation between expression of endothelial NO synthase and renal hemodynamic response to NO synthase inhibition.

*Am J Hypertens*. 1998 Jan;**11**(1 Pt 1):97-104.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998 Jan;**31**(1 Pt 2):435-9.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension*. 1999 Oct;**34**(4 Pt 2):920-3.

- Roman RJ, Maier KG, Sun CW, Harder DR, Alonso-Galicia M. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; **27**:855-865.
- Rosenblum WI. Selective impairment of response to acetylcholine after ischemia-reperfusion in mice. *Stroke* 1997; **28**:448-51.
- Rosenblum, W.I. Selective impairment of response to acetylcholine after ischemia/reperfusion in mice. *Stroke* 1997; **28**: 448-452.
- Rowland NE, Fregly MJ. Repletion of acute sodium deficit in rats drinking either low or high concentrations of sodium chloride solution. *Am J Physiol.* 1992 Mar; **262**(3 Pt 2):R419-25.
- Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A.* 1992; **14**(3):367-75.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1986 May; **250**(5 Pt 2):H815-21.
- Rump LC, Oberhauser V, von Kugelgen I. Purinoceptors mediate renal vasodilation by nitric oxide dependent and independent mechanisms. *Kidney Int.* 1998 Aug; **54**(2):473-81.
- Salter MW, Henry JL: Effects of adenosine 5'-monophosphate and adenosine 5'-triphosphate on functionally identified units in the cat spinal dorsal horn: Evidence for a differential effect of adenosine 5'-triphosphate on nociceptive vs non-nociceptive units. *Neuroscience* 1985; **15**:815-825
- Sanchez, A., Gomez, M.J., Dorantes, A.L., Rosales, J.L., Pastelin, G., Diaz, V., Posadas, F., Escalante, B. The effect of ovariectomy on depressed contractions to phenylephrine and KCl and increased relaxation to acetylcholine in isolated aortic rings of female compared to male rabbits. *Br.J.Pharmacol.* 1996; **118**:2017-2022.
- Satoh S, Stowe NT, Inman SR, Sankari BR, Magnusson MO, Novick AC. Renal vascular response to vasodilators following warm ischemia and cold storage preservation in dog kidneys. *J Urol* 1993; **149**:186-9.
- Schulze-Lohoff E, Zanner S, Ogilvie A, Sterzel RB. Extracellular ATP stimulates proliferation of cultured mesangial cells via P2-purinergic receptors. *Am J Physiol.* 1992 Sep; **263**(3 Pt 2):F374-83.
- Schwartzman M, Pinkas R, Raz A: Evidence for different purinergic receptors for ATP and ADP in rabbit kidney and heart. *Eur J Pharmacol* 1981; **74**:167-173.
- Sharma AD, Klein GJ: Comparative quantitative electrophysiological effects of adenosine triphosphate on the sinus node and atrioventricular node. *Am J Cardiol* 1988; **61**:330-335.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. In: *Statistical Methods*, Iowa State University Press, Iowa. 1980; p. 507.
- Stallone, J.N., Crofton, J.T., Share, L. Sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. *Am. J. Physiol.* 1991; **260**: H453-H458.

- Stone T. Therapeutic potencial of adenosine. *Scrip Magazine* july/august 1992; 41-43.
- Stutts MJ, Chinet TC, Mason SJ, Fullton JM, Clarke LL, Boucher RC. Regulation of Cl<sup>-</sup> channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;**89**(5):1621-5.
- Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Lüscher TF. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;**98**(4):899-905.
- Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension*. 1996 Jan;**27**(1):32-5.
- Van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*. 1979 Nov;**33**(5):999-1005.
- Van Benthuyzen KM, McMurtry IF, Horwitz LD. Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro. *J Clin Invest* 1987; **79**:265-74.
- Vander Kooy D, Dubyak GR, Moore RM, Moore JJ. Adenosine triphosphate activates the phospholipase-C cascade system in human amnion cells without increasing prostaglandin production. *Endocrinology*. 1989 Apr;**124**(4):2005-12.
- Vargas F, Moreno MRR, Osuna A: Renal vascular reactivity to ATP in ageing rats. *Med Sci Res* 1996; **24**: 263-265.
- Vargas F, Osuna A, Fernández-Rivas A: Renal vascular reactivity to ATP in hyper- and hypothyroid rats. *Experientia* 1996; **52**:225-229.
- Vargas F, Osuna A. Modulatory role of endothelium-derived relaxing factors on the response to vasoconstrictors and flow-pressure curve in the isolated perfused rat kidney. *J Vasc Res*. 1996 Mar-Apr;**33**(2):119-23.
- Vargas F, Sabio JM, Luna JD. Contribution of endothelium derived relaxing factors to acetylcholine induced vasodilatation in the rat kidney. *Cardiovasc Res*. 1994 Sep;**28**(9):1373-7.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998 Jun;**31**(6):1248-54.
- Verbeke M; Smollich B; Van de Voorde J; De ridder L. Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 1996 Apr;**7** (4):621-7.
- Verhagen AM, Attia DM, Koomans HA, Joles JA. Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Oct;**279**(4):F664-70.

- Verhagen AM, Hohbach J, Joles JA, Braam B, Boer P, Koomans HA, Gröne H. Unchanged cardiac angiotensin II levels accompany losartan-sensitive cardiac injury due to nitric oxide synthase inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2000 Jul 21; **400**(2-3):239-47.
- Vidal M, Hicks PE, Langer SZ: Differential effects of  $\alpha$ - $\beta$ -Metilen ATP on responses to nerve stimulation in SHR and WKY tail arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; **332**:384-390.
- Wangenstein, R., Moreno, J.M., Sainz, J., Rodriguez-Gomez, I., Chamorro, V., Luna, J.de Dios., Osuna, A., Vargas, F. Gender difference in the role of endothelium-derived relaxing factors modulating renal vascular reactivity. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; **486**:281-288.
- Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowless, R.G., Charles, I.G., Moncada, S., 1 Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994; **91**:5212-5216
- White , R.M., Rivera, C.O., Davison, C.A. Nitric oxide-dependent and independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; **292**: 375-380.
- Williams M. Purinergic drugs: opportunities in the 1990s. *Drug Dev Res* **28**: 438-444.
- Yang BC, Nicolini FA, Nichols WW, Mehta JL. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation following subtotal coronary artery occlusion in dogs. *Free Rastic Biol Med* 1993; **14**:295-302.
- You, J.P., Johnson, T.D., Childres, W.F. and Bryan Jr., R.M. Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP. *Am. J. Physiol.* 1997 ; **273**: pp. H1472–H1477.
- You, J., Johnson, T.D., Marelli, S.P. and Bryan, R.M. Functional heterogeneity of endothelial P<sub>2</sub> purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. *Am. J. Physiol.* 1999; **277**:pp893-900.
- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 15; **89**(16):7432-6.