

# Rol del endotelio en el efecto vasodilatador de la acetilcolina cuando el vaso aislado se somete a la acción contráctil de norepinefrina o de potasio

Drs. Manuel Ferreira, Roberto Correa, Claudio Puga, Yajaira de Sousa, Alejandro Illanes

Dpto. de Ciencias Fisiológicas, Bolívar, Universidad de Oriente.

## RESUMEN

*La acetilcolina depende de la conservación del endotelio vascular, para producir su efecto vasodilatador que es ocasionado por la liberación de un factor relajador derivado del endotelio y que corresponde al óxido nítrico. Se estudiaron las acciones de la acetilcolina, en manguitos aislados de aorta de rata con endotelio, contraídos por norepinefrina o cloruro de potasio. Se ensayaron dosis únicas de norepinefrina,  $10^{-6}$  M y también dosis crecientes y acumulativas desde  $10^{-8}$  hasta  $10^{-4}$  antes y después de la incubación con acetilcolina. Además, se sometió la preparación con endotelio a los efectos de una solución despolarizante de potasio y luego se le agregó acetilcolina,  $10^{-3}$ . También se observaron los efectos de la acetilcolina añadida previamente a la solución despolarizante. A modo de control, en otra serie experimental, se utilizó solución Krebs-Henseleit. La acetilcolina adicionada previamente a la solución de potasio antagoniza la contracción producida por esta solución despolarizante. En cambio, cuando la preparación es contraída previamente con dicha solución la acetilcolina no produce vasodilatación. La incubación en acetilcolina disminuye la acción contráctil de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina, probablemente por liberación de factor de relajación derivado del endotelio.*

**Palabras clave:** Endotelio. Reactividad vascular. Solución despolarizante. Acetilcolina.

## SUMMARY

*Acetylcholine depends on the vascular endothelium integrity, for the production of its vasodilator effect due to release of a relaxing factor derived from the endothelium corresponding to nitric oxide. Acetylcholine actions were studied, in isolated rat aorta segments with endothelium contracted with norepinephrine or potassium chloride. Single doses of acetylcholine were used,  $10^{-6}$  M as well as increasing an accumulative doses from  $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  before and after incubation with acetylcholine. Additionally, the endothelium preparation was exposed to the effects of a depolarizing potassium solution and later acetylcholine was added,  $10^{-3}$ . The effects of acetylcholine previously added to the depolarizing solution were also observed. As a control, in other experiments a Krebs-Henseleit solution was used. Acetylcholine added before the potassium solution antagonized the contraction produced by this depolarizing solution. When the preparation is contracted previously with that solution, acetylcholine did not produce vasodilation. The incubation in acetylcholine reduce the contractile action of increasing and accumulative doses of norepinephrine, probably for release of relaxation factor derived from the endothelium.*

**Key words:** Endothelium. Vascular reactivity. Depolarizing solution. Acetylcholine.

## INTRODUCCIÓN

En la pasada década, muchos estudios demostraron que el endotelio regula el tono vascular y que éste libera diferentes sustancias capaces de actuar sobre el músculo liso vascular (1,2).

Entre estas sustancias se menciona el factor de relajación derivado del endotelio (FRDE) y que,

según algunos autores, se corresponde con el óxido nítrico (ON). Este óxido nítrico es producido en la célula endotelial a partir del aminoácido L- arginina, y este radical libre se difunde al músculo liso vascular local, donde incrementa los niveles de guanilmonofosfato (GMPc) intracelulares por activación de la Guanilato ciclasa y así produce la relajación del músculo liso vascular (3-5).

Se ha descrito que la vida media de este óxido nítrico es de tan sólo 30 segundos (6) y es liberado por la acción de sustancias como la acetilcolina. De esta manera es como la acetilcolina relaja preparaciones previamente contraídas por norepinefrina (7,8).

Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura si la acetilcolina es capaz de actuar como antagonista cuando se usa previamente al ensayo de vasoconstrictores, como la solución despolarizante de potasio (K-70) o de norepinefrina (NE).

En esta situación experimental, es de esperar un menor efecto de los agentes vasoconstrictores por la presencia del FRDE en el baño, al ser éste liberado del endotelio vascular por la acetilcolina. Por otra parte, este neurotransmisor produce hiperpolarización en otros tejidos excitables y por este mecanismo, también la acetilcolina podría disminuir el efecto despolarizante del ión potasio. El cual, por ese mecanismo, produce intensas respuestas vasoconstrictoras (9).

En el presente trabajo, hemos comprobado que la acetilcolina agregada al baño que contiene al vaso aislado con endotelio, antagoniza parcialmente no sólo la respuesta vasoconstrictora al ión potasio, sino que también disminuye las respuestas vasoconstrictoras de varias dosis crecientes de norepinefrina.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas adultas Wistar, las cuales fueron sacrificadas mediante un golpe contundente, en la región occipital, para luego ser desangradas a través de la decapitación con guillotina. La aorta de la rata fue cuidadosamente disecada y removida a través del tórax abierto quirúrgicamente, colocada en una cápsula de Petri que contenía una solución de Krebs-Henseleit (K-H) a temperatura ambiente, burbujeada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. La solución K-H tenía la siguiente composición en mM: NaCl: 122,00; KCl: 4,87; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,20; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O: 1,20; glucosa x H<sub>2</sub>O: 11,15; CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O:

2,00; NaHCO<sub>3</sub>: 15,00; ácido diamino tetra acético (EDTA): 0,026.

Una vez limpiada quirúrgicamente del tejido conjuntivo y de la grasa que rodea la aorta, se seleccionó una zona, menos traumatizada y se seccionó transversalmente el vaso, separando manguitos de aorta de aproximadamente 5 mm de longitud. Dependiendo del protocolo de experimentación, se conservaba el endotelio o se extraía quirúrgicamente. Para lo cual se introducía una pinza fina y curva de uso oftalmológico en el interior del manguito, haciendo rodar y presionándolo suavemente tres o cuatro veces sobre un papel de filtro humedecido con solución K-H, y siguiendo la técnica aprendida de Vinet y col. ya descrita por nosotros en otra publicación (10).

El manguito se colocaba en ganchitos con forma de estribos y se montaba en un baño de órgano aislado con solución K-H, pH 7,4, a temperatura constante de 37°C y gasificando finamente con la misma mezcla gaseosa ya mencionada.

Se registraron los cambios de tono con un transductor de fuerza Grass FT 03 conectado a un fisiógrafo de la misma marca, y debidamente calibrado. Después de una hora de estabilización en solución K-H, la solución despolarizante utilizada, contenía los mismos componentes de la K-H, excepto que la concentración de NaCl era 56,7 mM por un total de 70,00 mM (11). Con esta solución despolarizante, se obtenía la contracción isométrica máxima de los manguitos, considerada ésta como 100% para efectos de medición y comparación de los resultados.

A los efectos de lograr los objetivos de este trabajo, se elaboró un protocolo en el que figuraban 4 grupos experimentales los cuales se detallan a continuación:

- Grupo 1: norepinefrina (NE), previamente + acetilcolina, (AcC), posteriormente, en preparaciones con endotelio y sin éste.
- Grupo 2: K-70 + acetilcolina después, en preparaciones con endotelio y sin éste.
- Grupo 3: acetilcolina + K-70 después, en preparaciones con endotelio y sin éste.
- Grupo 4: ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina antes y después de la incubación con acetilcolina, en preparaciones con endotelio.

Grupo 1. Esta serie experimental consistió en agregar acetilcolina después de haber alcanzado la respuesta máxima a una dosis de norepinefrina de 0,1 ml de una solución  $1 \times 10^{-6}$  M disuelta en los 15 ml de K-H que contenía el baño. Siendo su control, la respuesta máxima obtenida sólo con norepinefrina.

Se consideró que la preparación conservaba su endotelio, cuando se respetó al máximo la integridad de la preparación, y la relajación de ésta, por la acetilcolina previamente contraída por la norepinefrina, alcanzó un valor superior al 5%, al menos en una de las pruebas. Igualmente, se consideró como preparaciones sin endotelio aquellas en las cuales se practica una extracción mecánica y, al menos en una de las pruebas, se observó una contracción superior al 5% con la acetilcolina.

Grupo 2. La solución que contenía la preparación se cambiaba por una despolarización isosmótica con 70mM de KCl, y una vez obtenida la contracción isométrica máxima del manguito, se procedía a agregar 1 ml de una solución de acetilcolina  $1 \times 10^{-3}$  M disuelta en los 15 ml del baño y se esperaba al menos 5 minutos por la respuesta.

Grupo 3. Siguiendo a la serie experimental 2, se lavaba la preparación y se repetía la operación, pero ahora agregando acetilcolina antes de ensayar el K-70. Las respuestas a K-70 con acetilcolina se compararon con las repuestas máximas obtenidas sólo con K-70 (control). Cabe destacar que las pruebas de la contractilidad de la preparación se realizaron tanto al inicio como al final de cada experimento; esto, con la finalidad de demostrar que la capacidad contráctil del manguito se mantuvo a lo largo de toda la experiencia, es decir, hubo una integridad funcional del manguito.

Grupo 4. Esta serie consistió en: 1. Ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina sin lavar, desde 0,1 ml de una solución  $10^{-7}$  M hasta 0,1 ml de una solución  $10^{-4}$ M, dejando un intervalo para cada dosis de norepinefrina. Una vez observado el efecto máximo de la mayor dosis estudiada, se practicaba el lavado repetido del manguito, hasta alcanzar valores iguales a los controles iniciales. 2. Incubación en acetilcolina 1 ml en una solución  $10^{-3}$  M disuelto en los 15 ml de K-H del baño, durante 20 minutos. Al cabo de los cuales y sin remover la acetilcolina del baño, se procedía a 3. Ensayo de una segunda curva de dosis crecientes y acumulativas de NE de igual valor a las estudiadas previamente.

Los registros fueron medidos milimétricamente, tomando la respuesta al K-70 como el 100% para cada experimento, para efectos de procesamiento de los datos.

Los posibles cambios en el tiempo de dos curvas sucesivas crecientes y acumulativas de norepinefrina han sido descartados en trabajos anteriores de algunos de nosotros (Cuadro 5) (Correa RC, Illanes A, no publicado).

### Análisis estadístico

Los estudios estadísticos de los valores promedios, su error estándar, así como la aplicación del procedimiento de los datos pareados, el promedio de las diferencias, su error estándar, así como el cálculo de los niveles respectivos de significancia, se hicieron de acuerdo con nuestras publicaciones previas y los textos de Scheffler (12) y Bahn (13).

## RESULTADOS

1. Efectos de la acetilcolina sobre los manguitos aislados de aorta de rata con endotelio y sin éste, previamente contraídos con norepinefrina.

La acetilcolina relaja los manguitos aislados de aorta con endotelio en un valor promedio de 5,38% ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Efecto de la acetilcolina (AcC) sobre manguitos aislados de aorta de rata, precontraídos con norepinefrina (NE)

Tono en % (K-70= 100%)				
	Con endotelio		Sin endotelio	
	(NE)	(NE) + (AcC)	(NE)	(NE) + (AcC)
$\bar{X}$	55,5 ± 13,2	49,9 ± 9	64,1 ± 21,3	70,9 ± 22,2
n=	6		10	
$\bar{d} \pm eds$	-5,4 ± 2,1		6,8 ± 1,9	
p	< 0,05		< 0,01	

P=nivel de significación según test t Student, datos pareados.

(AcC)=acetilcolina, 1 ml de solución  $1 \times 10^{-3}$ M/en 15 ml.

(NE)=norepinefrina, 0,1 ml de solución  $1 \times 10^{-6}$ M/en 15 ml.

K-70=solución despolarizante isosmótica con 70 mM de KCl.

Por otra parte, la acetilcolina contrae los manguitos de aorta sin endotelio de una manera significativa ( $p < 0,01$ ) (Cuadro 2 y Figura 1).

2. Efectos de la acetilcolina sobre manguitos de aorta de rata contraídos por la solución despolarizante (K-70) con endotelio y sin éste.

2.1. En el Cuadro 2 vemos que la acetilcolina no modifica el tono del manguito de aorta de rata, cuando éste conserva el endotelio y está contraído previamente por solución despolarizante K-70.

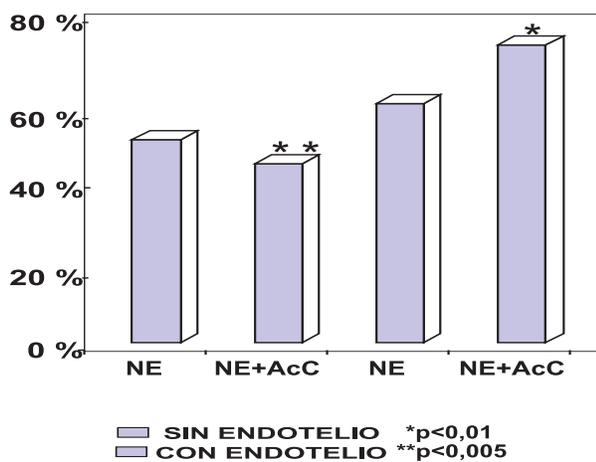


Figura 1. Efecto de la acetilcolina sobre manguitos aislados de aorta de rata precontraídos con norepinefrina. Fuente: Cuadro 1.

Cuadro 2

Efecto de la acetilcolina (AcC) sobre manguitos aislados de aorta de rata, precontraídos con solución despolarizante (K-70)

	Tono en % (K-70= 100%)			
	Con endotelio		Sin endotelio	
	K-70	K-70 + (AcC)	K-70	K-70 + (AcC)
$\bar{X}$	104,25 ± 7,26	100,99 ± 10,7	96,12 ± 9,97	102,86 ± 8,92
n=	6	6	10	10
$\bar{d} \pm eds$		-3,26 ± 1,73		6,74 ± 2,36
p		> 0,10		< 0,02

P=nivel de significación según test t Student, datos pareados (AcC)= acetilcolina, 1 ml de solución  $1 \times 10^{-3} M$ /en 15 ml.

$\bar{d}$ =promedio de las diferencias.

K-70=solución despolarizante isosmótica con 70 mM de KCl.

$\pm esd$ =± error estándar.

2.2. Por otra parte, en los vasos de rata desprovistos de su íntima y previamente contraídos por K-70, la acetilcolina aumenta el tono de los manguitos aislados de aorta significativamente ( $p < 0,002$ ).

Véase Cuadro 2 y Figura 2.

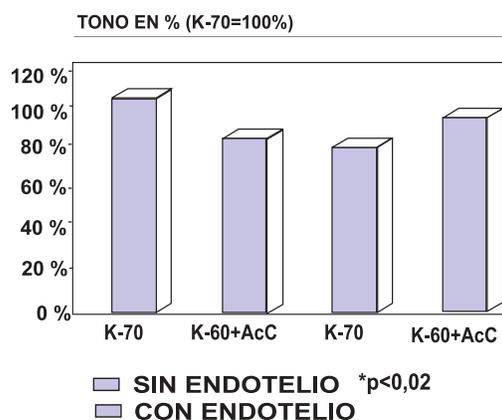


Figura 2. Efecto de la acetilcolina (AcC) sobre manguitos aislados de aorta de rata, precontraídos con solución despolarizante. Fuente: Cuadro 2.

3. Efectos de la solución despolarizante (K-70) sobre los manguitos aislados de aorta de rata, con endotelio y sin éste, previa adición de acetilcolina.

3.1. La acetilcolina administrada previamente a la preparación de aorta aislada, antagoniza parcialmente la contracción inducida por K-70 ( $p < 0,05$ ) en los vasos con endotelio.

3.2. La acetilcolina aplicada previamente al baño de la preparación sin endotelio no modifica la respuesta al K-70 ( $p > 0,05$ ) (Figura 3, Cuadro 3).

4. Influencia de la incubación con acetilcolina sobre el efecto contráctil de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina en manguitos de aorta de rata.

En la Figura y el Cuadro 4 se observa que luego de la incubación con acetilcolina, las respuestas a las dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina  $10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M$ , en los manguitos de aorta de rata disminuyen significativamente comparadas con las anteriores a la incubación, ( $p < 0,01, p < 0,001$  y  $p < 0,01$  para cada dosis de norepinefrina, respectivamente). Por otro lado,

para las respuestas, las dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina en las preparaciones incubadas en la solución control (K-H), no se observan variaciones estadísticamente significativas, antes y después de la incubación en K-H (Cuadro 5).

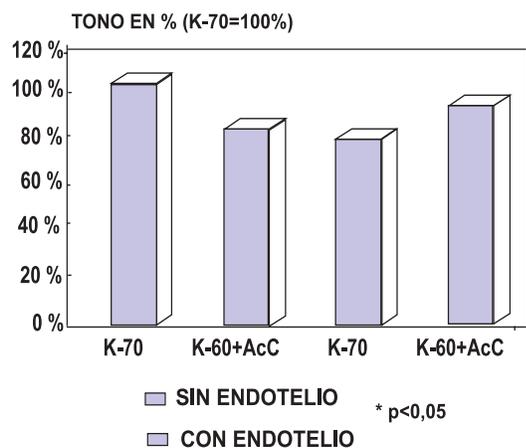


Figura 3. Efecto de la solución despolarizante sobre mangitos aislados de aorta de rata previa adición de acetilcolina. Fuente: Cuadro 3.

Cuadro 3

Efecto de la solución despolarizante (K-70) sobre mangitos aislados de aorta de rata, previa adición de acetilcolina

	Tono en % (K-70 = 100%)			
	Con endotelio		Sin endotelio	
	K-70	(AcC) + K-70	K-70	(AcC) + K-70
$\bar{X}$	104,25 ± 7,26	98,23 ± 9,73	96,12 ± 9,97	101,07 ± 9,05
n=	6	6	10	10
$\bar{d} \pm eds$		-3,26 ± 1,73		4,95 ± 2,73
P		< 0,05		> 0,05

P=nivel de significación según test t de Student, datos pareados.

(AcC)=acetilcolina, 1 ml de solución 1x10E-3M/en 15 ml.

$\bar{d}$ =promedio de las diferencias,  $\pm$  esd= error estándar.

K-70=solución despolarizante isosmótica con 70 mM de KCL.

$\bar{X}$ =promedio  $\pm$  desviación estándar.

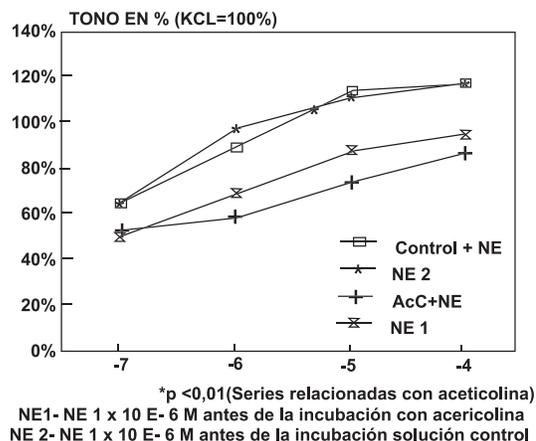


Figura 4. Efecto de la norepinefrina en dosis crecientes y acumulativas, sobre el tono de mangitos aislados de aorta torácica de rata, antes y después de incubarlos en acetilcolina o solución control. Fuente: Cuadro 4 y 5.

Cuadro 4

Influencia de la incubación con acetilcolina sobre el efecto contráctil de la norepinefrina en dosis crecientes y acumulativas en mangitos aislados de aorta torácica de rata

	Norepinefrina (NE)			
	7	6	5	4
$\bar{X} \pm est$	49,8 ± 5,9	69,3 ± 12	88,9 ± 13	98,4 ± 10
n	6	6	6	6
d	2,73	19,48	19,62	9,48
esd	0,65	43,43	0,91	1,43
P' <	0,61	0,01	0,001	0,01
P' >				
	(AcC) + (NE)			
$\bar{X} \pm esd$	52,1 ± 9,7	58,6 ± 10,5	75,5 ± 13	88,7 ± 13,4
n	6	6	6	6
d	2,34	-10,67	-13,35	-9,72
esd	3,11	1,74	1,77	2,26
P'' >	0,2			
P'' <		0,01	0,001	0,01
P' >	0,2			
P' <		0,01	0,001	0,001

(NE)=primer ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina.

(AcC)=acetilcolina 0,1 ml de solución 1x10E-3M/ 15 ml.

(AcC + NE)=segundo ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina, después de la incubación en acetilcolina.

$\bar{X} \pm est$ =promedio  $\pm$  error estándar.

P'=nivel de significación estadística según test de Student, para datos pareados entre cada dosis de norepinefrina y su estado anterior inmediato (P).

P''=datos pareados entre una misma dosis de norepinefrina antes y después de la incubación con AcC.

Cuadro 5

Efecto de la norepinefrina sobre el tono de manguitos aislados de aorta de rata, antes y después de incubarlos en solución control

		Norepinefrina (NE)			
Concentraciones	7	6	5	4	
$\bar{X} \pm \text{est}$	64,6 ± 9	98 ± 9	112,9 ± 4	119,1 ± 10	
n	10	10	10	10	
		Solución control (vehículo) + NE			
$\bar{X} \pm \text{esd}$	64,5 ± 9	89,6 ± 12,7	115 ± 12,5	119 ± 12	
n	10	10	10	10	
d	-0,1	-8,42	1,27	0,7	
esd	2,74	2,63	2,03	1,23	
P>	0,2		0,2	0,2	
P<		0,02			

(NE)=primer ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina.

Solución control + NE=segundo ensayo de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina después de la incubación en solución control.

$\bar{X} \pm \text{est}$ =promedio ± error estándar.

P=nivel de significación estadística según test de Student, para datos pareados entre una misma dosis de norepinefrina antes y después de la incubación con solución control.

## DISCUSIÓN

Hemos comprobado que la acetilcolina relaja los manguitos aislados de aorta de rata, con endotelio y que contrae los sin endotelio, cuando ambos tipos de preparaciones se encuentran contraídos por una dosis submáxima de norepinefrina. El efecto relajador de la acetilcolina sólo se observa cuando el vaso conserva la integridad de su endotelio y este efecto se debe a la formación y liberación, por la acetilcolina, de un factor de relajación derivado del endotelio (FRDE); el cual correspondería al óxido nítrico (4,8). Éste se formaría a partir de la L-arginina, la cual, por activación de una enzima específica, liberaría el óxido nítrico que difundiría desde el endotelio a la capa muscular, produciendo el efecto relajador. En esta capa, por acción del óxido nítrico, aumentan los niveles de guanilmonofosfato (GMPc) y con ello disminuyen las concentraciones de calcio libre. Esta disminución del calcio iónico intracelular sería en último término la responsable de la relajación de la musculatura

lisa. También se ha postulado una acción hiperpolarizante de la AcC que mediada por el óxido nítrico actuaría sobre, las fibras musculares lisas facilitando la relajación, en razón de que algunos investigadores han publicado que los nitritos producen efectos hiperpolarizantes sobre la membrana de la célula muscular lisa (14). Por otra parte, en los vasos desprovistos de su íntima, el neurotransmisor colinérgico produce una mayor contracción, cuando los manguitos están previamente contraídos por la dosis submáxima de NE (15).

En ausencia del órgano responsable de la producción de FRDE y de la relajación del vaso, la AcC produciría, por el contrario, despolarización, actuando ahora directamente sobre la membrana de la fibra contráctil y aumentado por este mecanismo la permeabilidad de ésta a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ .

La AcC agregada al baño del vaso aislado con endotelio, antagoniza parcialmente la contracción producida a continuación por K-70, adicionado este último en el minuto siguiente, sugiriendo que el factor de relajación derivado del endotelio alcanza a difundir del endotelio a la capa muscular y poner en acción los mecanismos bases de la relajación, antes de que se ejerza la acción despolarizante del potasio sobre la fibra y resulte al cabo una contracción disminuida. Sin embargo, cuando el manguito con endotelio se encuentra ya contraído por el K-70, la acetilcolina falla en producir vasodilatación y su efecto es nulo; esto concuerda con los estudios de Rappaport y col. (16,17) y más recientemente Gupta (18) y Palmer (5,8), indicando quizás que la solución despolarizante del vaso, inhibe o bloquea la formación y/o liberación del óxido nítrico en esta situación experimental. Al utilizar técnicas bioquímicas, se ha visto que las concentraciones altas de potasio inhiben las reacciones que conducen a la formación de óxido nítrico (9,18). En cambio y explícitamente, la AcC agregada previamente al baño que contiene la preparación sin íntima, no modifica la respuesta contráctil al K-70, dejando establecido que la AcC necesita del endotelio para antagonizar la contracción producida por el agente despolarizante. Lo que obviamente no puede producirse en ausencia de la estructura formadora de FRDE (3,7).

En cambio, la AcC administrada a la preparación, una vez inducida la contracción máxima por la solución despolarizante, logra aumentar aún más el tono muscular del vaso sin endotelio, poniendo en evidencia que la AcC en esta situación, refuerza la

actividad contráctil por mecanismos diferentes a los desencadenados por la despolarización, debida al ión potasio. Al estar la fibra con un potencial bajo de membrana podrían abrirse más canales para el ión calcio, con un mayor ingreso de este ión a la célula.

La incubación con AcC durante 20 minutos y su conservación en el baño, disminuye la acción contráctil de varias concentraciones del neurotransmisor adrenérgico en preparaciones con endotelio. Sería el FRDE liberado previamente por la AcC el que se encargaría de oponerse al aumento de fuerza, producto del efecto de la dosis creciente de la norepinefrina en esta preparación con su íntima intacta.

### REFERENCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
2. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomabe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
3. Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan D, Khan AS. Evidence that endothelium derived factor of rabbit aorta is nitric oxide. En: Bevean JA, Majewski H, editores. *Vascular neuroeffector mechanisms*. Oxford: IRL, Press Ltd, 1988:77-84.
4. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci EE.UU.* 1987;84:9265-9269.
5. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide L-arginine. *Nature* 1992;333:664-666.
6. Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN. Vasorelaxant properties of endothelium derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than oxide nitric. *Nature* 1990;345:161-163.
7. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1984;24:175-197.
8. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
9. De Mey JG, Vanhoutte PM. Interaction between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , exchanger and the direct inhibitory effect of acetylcholine on canine femoral arteries. *Circ Res* 1980;46:826-835.
10. Illanes AG, Penna M, Martinez JL. The vascular relaxing effect of a factor released by rat atria distension. *Gen Pharmac* 1993;24(2):315-319.
11. Vinet R, Brieva C, Pinaridi G, Penna M. Modulation of alpha-adrenergic induced contractions by endothelium-derived relaxing factor in rat aorta. *Gen Pharmac* 1991;22:137-142.
12. Scheffler WC. *Bioestadística*. Mexico: Fondo educativo interamericano, S.A. 1981:79-84.
13. Bahn AK. *Basic medical statistics*. New York: Grune & Stratton, 1972:144-156 y 245.
14. Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neil TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature* 1990;346:69-71.
15. Kato T, Iwana Y, Okumura K, Ito T. Prostaglandin H2 may be the endothelium derived contracting factor release by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1989;15:475-481.
16. Rappaport R, Schwartz RS, Murad F. Effects of sodium-potassium pump inhibitors and membrane depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ Res* 1985;57:164-170.
17. Rappaport RM, Waldman SA, Schawart RJ, Murad F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1985;115:219-229.
18. Gupta S, McArthur. Effect of vascular  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase activity by nitric oxide a cGMP-independent effect. *Am Physiol Society* 1994;H2146-H2151.