

EFFECTO DE ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II Y α_2 ADRENERGICOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE OXIDO NITRICO INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

SUSANA JEREZ, MARIA PERAL DE BRUNO, ALFREDO COVIELLO

Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET) y Fundación INELCO, Tucumán

Resumen El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la interacción entre el sistema adrenérgico y la liberación de óxido nítrico (ON) estimulada por angiotensina II en aorta de conejo. Anillos de aorta torácica se colocaron en un baño de órgano aislado. Se equilibró durante 30 min, se lavó y se agregó angiotensina II a diferentes dosis, dejándose actuar 20 min. En otro grupo se efectuaron dos estimulaciones con un intervalo de 60 min. Los antagonistas de angiotensina II: losartan, PD 123319 y Sar¹-Leu⁸-angiotensina II; y el antagonista α_2 adrenérgico (yohimbina), todos 10^{-5} M, y L-NAME o D-NAME 10^{-2} M, se agregaron antes de estimular con angiotensina II 10^{-6} M o $5 \cdot 10^{-6}$ M. A otro grupo, además de losartan o PD 123319, se agregó yohimbina. La determinación de nitritos se realizó con el reactivo de Griess. La angiotensina II 10^{-8} M hasta 10^{-6} M, incrementó la producción de metabolitos de ON medidos como nitritos con respecto al control. A dosis mayores hubo una disminución con respecto a 10^{-6} M. La liberación de nitritos inducida por angiotensina II cayó en la segunda estimulación con la hormona en todos los casos, mientras el L-NAME la bloqueó. Los antagonistas de angiotensina II la incrementaron sólo a dosis máxima de la hormona, efecto anulado por yohimbina. Asimismo, yohimbina disminuyó la producción de nitritos a dosis de angiotensina II $5 \cdot 10^{-6}$ M pero no 10^{-6} M. Estos resultados permiten postular que la liberación de ON inducida por angiotensina II sería en parte mediada por estimulación de receptores α_2 . Los antagonistas de angiotensina II desenmascararían este efecto a dosis máxima de la hormona, mientras que a dosis supramáximas prevalecerían mecanismos inhibitorios que serían compensados por activación α_2 .

Palabras claves: antagonistas de angiotensina II, óxido nítrico (ON), yohimbina

Abstract *Effect of angiotensin II and α_2 receptor antagonists on angiotensin II-stimulated nitric oxide release.*

The aim of the present work was to characterize the interaction between the adrenergic system and angiotensin II-stimulated nitric oxide (NO) release in rabbit aorta. Rings of thoracic aorta were placed in an isolated organ bath. Equilibration was performed during 30 min, and after washing, angiotensin II was added at different concentrations, during 20 min. In another group two stimulations were performed with an interval of 60 min. Angiotensin II antagonists: losartan, PD 123319 and Sar¹-Leu⁸-angiotensin II, α_2 adrenergic antagonist: yohimbine, all at 10^{-5} M and L-NAME or D-NAME 10^{-2} M, were added before stimulation with angiotensin II 10^{-6} M or $5 \cdot 10^{-6}$ M. In another group, besides losartan or PD 123319, yohimbine was added. Nitrite determination was performed with Griess reagent. Angiotensin II 10^{-8} to 10^{-6} M increased NO metabolite production measured as nitrites referred to the control. In higher concentrations there was a diminution in relation to 10^{-6} M. Angiotensin II nitrite release fell in the second stimulation with the hormone in all cases, whereas it was blocked by L-NAME. It was increased by angiotensin II antagonist only at maximal concentrations of the hormone, an effect abolished by yohimbine. Likewise, yohimbine diminished nitrite production at concentrations of angiotensin II of $5 \cdot 10^{-6}$ but not at 10^{-6} M. These results allow us to postulate that NO release induced by angiotensin II would be in part mediated by α_2 receptors. Angiotensin II antagonists unmask these effects at maximal concentrations of the hormone, whereas at supramaximal concentrations inhibitory mechanisms would prevail, which would be balanced by α_2 activation.

Key words: angiotensin II-antagonists, nitric oxide (NO), yohimbine

La angiotensina II (Ang II), el principal péptido biológicamente activo del sistema renina angiotensina, desempeña un papel importante en la regulación de la presión arterial. Produce vasoconstricción a través de la

interacción con receptores AT₁ presentes en el músculo liso vascular y de su capacidad de modular la función simpática neural. Asimismo, se conoce que actúa sobre el endotelio a través de receptores específicos de tipo AT₁,¹ estimulando la liberación de agentes vasoconstrictores: endotelina^{2,3}, y algunos derivados de la acción de la lipooxigenasa sobre el ácido araquidónico^{4,5}, y de agentes vasodilatadores: óxido nítrico (ON)⁶⁻⁹, prostaciclina y algunos derivados de la citocromo p450

Recibido: 8-III-2001

Aceptado: 26-IV-2001

Dirección postal: Dra. Susana Jerez, España 3706, 4000 Tucumán, Argentina
Fax: (54-381) 4364120

e-mail: sjerez@tucbbs.com.ar

monooxigenasa¹⁰. El efecto contráctil resultante de la acción de la Ang II sobre el músculo liso vascular dependería, entonces, de un adecuado balance entre estos factores. El ON es el vasodilatador más importante derivado del endotelio y existen evidencias de que una disminución en su producción, limitaciones en su acción o incrementos en su metabolismo están etiológicamente ligados a la enfermedad vascular¹¹. En este sentido, en pacientes con hipertensión arterial se ha comprobado una capacidad vasodilatadora reducida del endotelio, que puede ser corregida mediante tratamiento con antihipertensivos¹².

Por otra parte, se sabe que la respuesta del músculo liso vascular al efecto contráctil de la noradrenalina (NA) está reducida en presencia de endotelio, y este fenómeno se debe a la activación de receptores α_2 adrenérgicos endoteliales, que induce la liberación de ON¹³. Asimismo, se ha comunicado que la Ang II puede liberar NA desde las terminaciones adrenérgicas presentes en las paredes vasculares¹⁴, además de facilitar la función simpática periférica por diferentes mecanismos, entre ellos favorecer la liberación de NA desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas¹⁵ o inhibir la recaptación neuronal del neurotransmisor en ciertos tejidos¹⁶. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la liberación endotelial de ON estimulada por Ang II y la interacción entre los principales sistemas responsables de mantener el tono del músculo liso vascular: renina-angiotensina, endotelial y adrenérgico, a nivel de la producción de ON en el vaso intacto, medido indirectamente por la liberación de nitritos.

Materiales y métodos

Se usaron conejos machos neocelandeses o híbridos de Flanders. El peso de los animales vivos fue de 1,500 a 2,500 Kg. Se mataron por la técnica de desangrado. Los conejos fueron adquiridos de un criadero de San Miguel de Tucumán, donde recibieron una alimentación a base de balanceados comerciales. La aorta torácica fue cuidadosamente disecada y limpiada de todo resto de tejido graso y conjuntivo.

Para el baño de órgano aislado y la conservación en general del material biológico empleado se usó una solución de Krebs modificada, cuya composición fue la siguiente (mM): NaCl 128, KCl 4.7, NaHCO₃ 14.4, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, Na₂EDTA 0.1 y glucosa 11.1, pH 7.2. Esta solución fue preparada diariamente a partir de soluciones madres.

Las soluciones de las diferentes drogas empleadas en este trabajo fueron diluidas en agua destilada antes de ser agregadas al baño. Su concentración fue 100 veces mayor a la concentración final deseada.

Medición de nitritos

Los nitritos y nitratos son los principales metabolitos del ON, por lo tanto la determinación, ya sea de nitritos solamente o la de nitratos luego de su reducción enzimática, es una medida indirecta de la producción de ON. La reacción de Griess, en la cual estos metabolitos son transformados en compuestos diazo

coloreados, constituye uno de los ensayos más utilizados¹⁷ con esta finalidad.

La técnica empleada por otros autores en microvasos coronarios aislados de perro^{18,19} fue adaptada para medir la liberación de nitritos en anillos de aorta torácica de conejo. Cada uno de los anillos fue colocado en recipientes plásticos de 4 ml de capacidad. El sistema se conectó mediante tubuladuras de goma a un tubo de gas carbógeno, con el objeto de garantizar el burbujeo constante. Simultáneamente, los recipientes fueron sumergidos en un baño termostático a 37 °C. Al comenzar el experimento las arterias se equilibraron durante 30 minutos con 0.5 ml de solución de Krebs, en ausencia o presencia de los antagonistas, según el protocolo. Al cabo de este periodo, el medio de incubación se descartó y se colocó 0.5 ml de solución fresca con o sin Ang II. Se dejó actuar 20 minutos y luego se sacaron las arterias, se secaron cuidadosamente, se pesaron y el remanente se utilizó para dosar nitritos mediante el agregado del reactivo de Griess: a los 0.5 ml se les añadió 0.45 ml de sulfanilamida 0.1% y 0.05 ml de α -naftil etilén diamina 0.2% (volumen final=1 ml). El color rosado desarrollado se leyó al cabo de 15 minutos en un espectrofotómetro a 540 nm, que fue calibrado a cero con el blanco de reactivos. Para calcular el contenido de nitritos presentes, se hicieron diariamente curvas de calibración con soluciones estándar de nitrito de sodio en concentraciones crecientes: 10⁻⁶ M, 2.5. 10⁻⁶ M, 5.10⁻⁶ M, 7.5. 10⁻⁶ M, 5.10⁻⁵ M, 2.5.10⁻⁵ M, 7.5.10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M¹⁸. El análisis de regresión de la curva se efectuó mediante un programa estadístico: MICROSTA, y fueron aceptadas sólo aquellas curvas con un coeficiente de correlación de Pearson igual o mayor que 0,9. Los datos se expresaron como picomoles de nitritos liberados por ml y por mg de tejido húmedo.

Protocolos experimentales

En primer lugar se efectuaron curvas dosis respuesta a la Ang II. Después del período de equilibración cada anillo fue estimulado con una dosis única de 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 5.10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 5.10⁻⁶ M y 10⁻⁵ M de Ang II. Para analizar si la liberación de ON observada era específica de la óxido nítrico sintetasa, se trabajó con su inhibidor, el L-NAME 10⁻² M, usando como control su isómero inactivo, el D-NAME. Estas drogas fueron agregadas al medio de incubación durante los 30 minutos del periodo de equilibración e inmediatamente antes de efectuar una estimulación con Ang II 5.10⁻⁶ M.

Con el objeto de establecer el subtipo de receptor de Ang II involucrado en la liberación endotelial de ON se trabajó con antagonistas específicos de los receptores AT₁ (losartan 10⁻⁵ M) y AT₂ (PD 123319 10⁻⁵ M), y con el antagonista no selectivo (Sar¹-Leu⁸-angiotensina II 10⁻⁵ M). Estas drogas fueron agregadas al medio de incubación durante el periodo de equilibración y antes de realizar una estimulación única con Ang II 10⁻⁶ M o 5.10⁻⁶ M.

Para evaluar la interacción entre la producción endotelial de ON estimulada por Ang II y el sistema adrenérgico, se llevaron a cabo los siguientes protocolos: 1) un bloqueante de los receptores α_2 (yohimbina 10⁻⁵ M), fue agregado al medio de incubación durante el periodo de equilibración y antes de estimular con Ang II 10⁻⁶ M y 5.10⁻⁶ M 2) en un protocolo similar al anterior se agregaron al medio de incubación además de yohimbina, ya sea losartan 10⁻⁵ M o PD 123319 10⁻⁵ M.

Con el objeto de verificar si la producción de ON estimulada por Ang II in vitro se modifica con el tiempo o presenta taquiflaxia, se realizaron dos estimulaciones sucesivas en el mismo anillo con distintas dosis de Ang II: 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M y 10⁻⁵ M. La primera se efectuó inmediatamente después de los 30 minutos de equilibración, se lavó con solución de Krebs durante una hora y se efectuó la segunda estimulación.

Estadística

Todos los valores representan la media ± ES. Las comparaciones con respecto al control fueron efectuadas mediante test de *t* para muestras pareadas o no pareadas según el caso y las comparaciones entre los grupos mediante ANOVA con post test de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas cuando *p* fue menor al 5% en una tabla de dos colas.

Drogas

Ang II, Sar¹-Leu⁸-angiotensina II, L-NAME, D-NAME, α-naftil etilen diamina, sulfanilamida y yohimbina fueron adquiridas de Sigma Chemical Co (St Louis, USA). PD 123319 fue adquirido a RBI (Research Biochemicals International). Losartan fue generosamente suministrado por Merck.

Resultados

Liberación de nitritos inducida por angiotensina II

El efecto de la Ang II sobre la liberación endotelial de nitritos fue dependiente de la dosis: se observó un incremento desde 10⁻⁸ M hasta alcanzar un máximo a 10⁻⁶ M. A dosis mayores, la producción de nitritos cayó con respecto a Ang II 10⁻⁶ M, pero fue significativamente superior al basal (Fig. 1).

Se observó una disminución estadísticamente significativa en la producción de nitritos a todas las dosis estudiadas cuando se realizó una segunda estimulación con Ang II en el mismo anillo, al cabo de 60 minutos de lavados con solución de Krebs (Fig. 2).

El L-NAME, en dosis de 10⁻² M inhibió la producción de nitritos inducida por Ang II 5.10⁻⁶ M (Fig. 4).

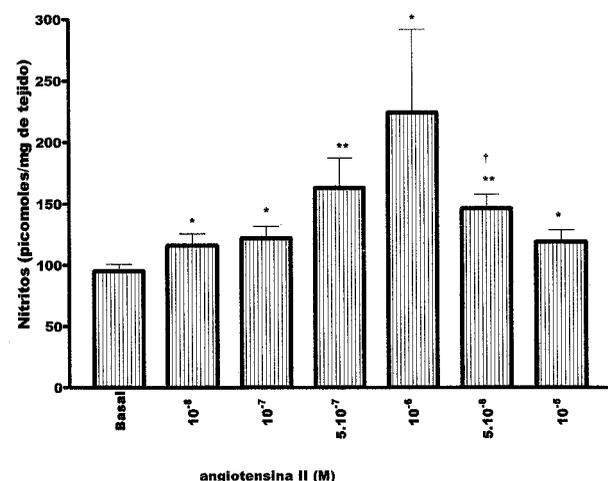


Fig. 1.- Producción de nitritos estimulada por diferentes dosis de angiotensina II. ** *p*<0.01; * *p*<0.05 indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal (test de *t* para muestras pareadas). † *p*<0.05 indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a angiotensina II 10⁻⁶ M (ANOVA con post test de Duncan). Los resultados son expresados como media ± ES de 15 experimentos.

Efecto de antagonistas de los receptores de angiotensina II

Tanto losartan 10⁻⁵ M como PD123319 10⁻⁵ M y Sar¹-Leu⁸-angiotensina II 10⁻⁵ M aumentaron la producción

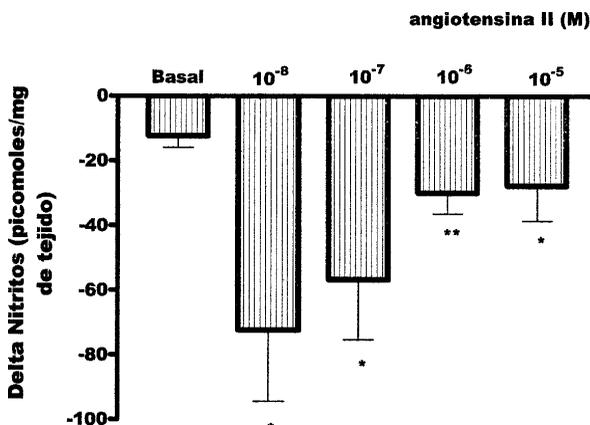


Fig. 2.- Diferencias en la liberación de nitritos inducida por angiotensina II entre la segunda y la primera estimulación con la hormona a distintas dosis. * *p*<0.05 y ** *p*<0.01 indica diferencias estadísticamente significativas entre los valores de nitritos dosados en la segunda vs la primera estimulación con angiotensina II (test de *t* para muestras pareadas). Los resultados son expresados como media ± ES de 8-10 experimentos.

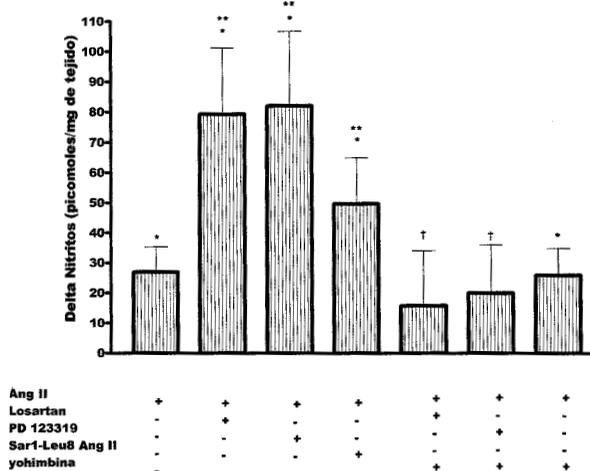


Fig. 3.- Producción de nitritos estimulada por angiotensina II 10⁻⁶ M (Ang II) en ausencia (-) o presencia (+) de Losartan 10⁻⁵ M, PD 123319 10⁻⁵ M, Sar1-Leu8-angiotensina II 10⁻⁵ M (Sar1-Leu8-Ang II) o yohimbina 10⁻⁵ M. * *p*<0.05 indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal (test de *t* para muestras pareadas); ** *p*<0.05 indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a Ang II 10⁻⁶ M; † *p*<0.05 indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a los anillos tratados con Losartan o PD 123319 (ANOVA de dos vías con post test de Duncan). Los resultados son expresados como media ± ES de las diferencias (delta) entre anillo control y experimental (n= 8-10).

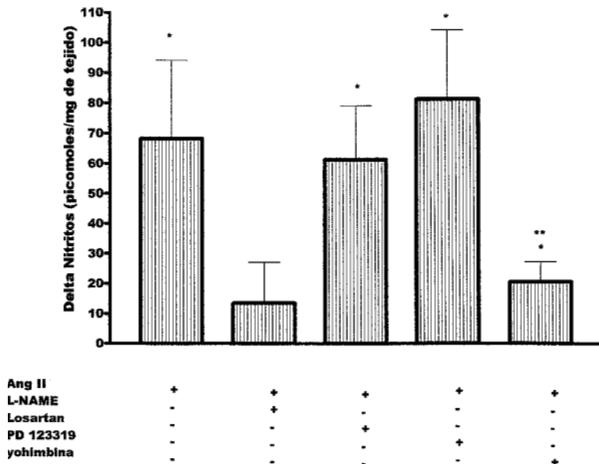


Fig. 4.— Producción de nitritos estimulada por angiotensina II 5.10^{-6} M (Ang II) en ausencia (-) o presencia (+) de L-NAME 10^{-2} M, Losartan 10^{-5} M, PD 123319 10^{-5} M, o yohimbina 10^{-5} M. * $p < 0.05$ indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal (test de *t* para muestras pareadas); ** $p < 0.01$ indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a Ang II 5.10^{-6} M (ANOVA con post test de Duncan). Los resultados son expresados como media \pm ES de las diferencias (delta) entre anillo control y experimental (n= 10).

de nitritos inducida por Ang II 10^{-6} M (Fig. 3). Sin embargo, ni losartan ni PD 123319 tuvieron efecto sobre la liberación de nitritos estimulada por la hormona a dosis de 5.10^{-6} M (Fig. 4).

Efecto de la yohimbina

Yohimbina 10^{-5} M fue capaz de anular la producción de nitritos inducida por Ang II 10^{-6} M en presencia de losartan y PD123319. Sin embargo no modificó la liberación de nitritos inducida por Ang II a esa dosis en ausencia de los antagonistas (Fig. 3). A dosis de Ang II 5.10^{-6} M, yohimbina disminuyó significativamente la producción de nitritos, aunque no la eliminó completamente (Fig. 4).

Discusión

En el presente trabajo se pudo observar que la liberación de nitritos inducida por Ang II en aorta de conejo fue dependiente de la dosis: aumentó hasta alcanzar la respuesta máxima y disminuyó a partir de allí. Existen datos bibliográficos que confirman la liberación de nitritos estimulada por Ang II en distintos tejidos: arterias coronarias de perro¹⁸, arterias renales de rata²⁰ y en cultivos de células endoteliales⁹, sin embargo estos autores no estudiaron dosis mayores de 10^{-6} M para comprobar si se había alcanzado la respuesta máxima y analizar el efecto de dosis supramáximas. Otro hallazgo original es que la producción de nitritos disminuye cuan-

do se estimula el mismo anillo por segunda vez al cabo de 60 minutos de lavados con solución de Krebs. Esto podría atribuirse a que el receptor de Ang II sufre un fenómeno de desensibilización, cuyo mecanismo ha sido ampliamente estudiado. Recientemente, algunos autores comunicaron que podría deberse a un desacoplamiento en la transducción de la señal²¹ o activación de la protein kinasa C²².

La observación de que todos los antagonistas de los receptores de Ang II empleados incrementan la producción de nitritos a dosis máxima pero no a dosis supramáximas es un hallazgo que no coincide con algunos trabajos de la bibliografía, que demuestran un bloqueo de la producción de ON estimulada por Ang II con losartan^{9, 18, 20}, PD 123319 y antagonistas peptídicos¹⁸ de la Ang II. Es ampliamente conocido que el antagonista de los receptores AT_1 losartan, reduce la presión arterial en la hipertensión esencial y en distintos modelos experimentales. Aunque su acción hipotensora se debe principalmente a su capacidad para evitar la unión de la Ang II a su receptor, algunos autores postulan la existencia de mecanismos adicionales involucrados²³⁻²⁵. Ellos comprobaron que inhibidores de óxido nítrico sintetasa disminuyen el efecto antihipertensivo del losartan, sugiriendo que el ON es necesario para la expresión total de su acción. Asimismo, comunicaron que el losartan incrementó los niveles de nitratos plasmáticos y la magnitud de la respuesta a acetilcolina en ratas espontáneamente hipertensas ancianas²⁶. El hecho de que el antagonista de AT_2 , PD 123319, tenga un efecto similar al losartan, podría deberse a que en presencia de antagonistas específicos AT_1 , la Ang II se une a los receptores AT_2 que no se encuentran bloqueados. En este sentido ha sido demostrado que la Ang II es capaz de estimular la síntesis de ON a través de la interacción con receptores AT_2 en células endoteliales²⁷. Sin embargo, el bloqueo de los dos subtipos de receptores con Sar¹-Leu⁸-angiotensina II, también incrementó la liberación de nitritos, por lo tanto no se puede atribuir el efecto del losartan o el PD 123319 a la acción de la Ang II sobre el correspondiente receptor no bloqueado. En ninguno de los trabajos anteriormente mencionados^{9, 18, 20}, en los que se comunicó bloqueo del efecto de la Ang II con antagonistas específicos e inespecíficos, se logró eliminar totalmente la liberación de nitritos inducida por la hormona, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo al de los receptores de Ang II. Sin embargo, no hubo una explicación del fenómeno.

El hecho de que la yohimbina, un bloqueante α_2 adrenérgico, logre anular el aumento en la producción de nitritos inducida por los antagonistas de la Ang II y disminuya la producción de nitritos inducida por Ang II a dosis supramáximas pero no máximas nos estaría indicando que parte de la liberación de nitritos por Ang II sería indirecta y podría estar mediada por receptores

α_2 , constituyendo el mecanismo alternativo al de los receptores de Ang II. Se conoce por datos de la bibliografía que dicha hormona estimularía la liberación de NA desde las terminales nerviosas adrenérgicas¹⁵ que se encuentran presentes en las paredes vasculares¹⁴, y esta hormona activaría receptores α_2 endoteliales, liberando ON¹³. Este efecto indirecto de la Ang II mediado por receptores α_2 estaría enmascarado por la producción directa de nitritos a través de la estimulación de receptores de Ang II endoteliales, por eso se pone de manifiesto cuando dichos receptores están bloqueados (a dosis máximas de la hormona). Esto explica el hecho de que yohimbina no modifique la liberación de nitritos inducida por Ang II 10^{-6} M en ausencia de sus antagonistas.

Nuestra observación del efecto de los antagonistas de los receptores de Ang II sumado a la inhibición en la producción de nitritos a dosis supramáximas nos permite postular que simultáneamente a la activación de óxido nítrico sintetasa, se desencadenan mecanismos que conducen a la destrucción del ON formado, y que adquieren relevancia a dosis elevadas de la hormona. Dichos mecanismos podrían involucrar a agentes oxidantes. En este sentido se comunicó que la Ang II estimula tanto la producción de nitritos como la de peroxinitrito en cultivo de células endoteliales⁹ y en aorta torácica de ratas²⁸. Asimismo, otros autores demostraron que la Ang II aumenta la producción de anión superóxido por activación de NADH Y NADPH oxidasa²⁹. La liberación de nitritos inducida por Ang II sería, por lo tanto, el resultado de un equilibrio entre las vías metabólicas que conducen a su formación y las que conducen a su destrucción. La disminución en los niveles de ON por activación de mecanismos inhibitorios, que se desencadenarían simultáneamente con los mecanismos estimulantes, sería predominante a dosis supramáximas y se compensarían por la activación de los receptores α_2 . Por este motivo, los antagonistas de los receptores de Ang II carecen de efecto, aunque yohimbina fue capaz de disminuir la liberación de nitritos inducida por la hormona, a esta dosis. Esto explicaría la disminución en la producción de nitritos observada con dosis superiores a 10^{-6} M.

En conclusión, este trabajo aporta evidencia de la interacción entre los sistemas responsables de mantener el tono del músculo liso vascular: endotelial, renina-angiotensina y adrenérgico a nivel de la producción de ON en el vaso intacto.

Bibliografía

1. Pueyo ME, N'Diaye N, Michel JB. Angiotensin II-elicited signal transduction via AT₁ receptors in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 79-84.
2. Webb ML, Dickinson KEJ, Delaney CL, Kiu ECK, Serafino R, Cohen RB, Monshizadegan H, Moreland S. The endothelin receptor antagonist, BQ-123, inhibits angiotensin II-induced contractions in rabbit aorta. *Biochim Biophys Res Comm* 1992; 185: 887-92.
3. Chen LH, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Heterogeneity in vascular smooth muscle responsiveness to angiotensin II: role of endothelin. *Hypertension* 1995; 26: 83-8.
4. Lin L, Nasjletti A. Role of endothelium-derived prostanoid in angiotensin-induced vasoconstriction. *Hypertension* 1991; 18: 158-64.
5. Takizawa H, Dellipizzi AM, Nasjletti A. Prostaglandin I₂ contributes to the vasodepressor effects of baicalein in hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 866-71.
6. Zhang J, Pfaffendorf M, Zhang JS, Van Zwieten PA. Influence of the vascular endothelium on angiotensin II-induced contractions in rabbit renal artery. *Fund Clin Pharmacol* 1995; 9: 25-9.
7. Zhang J, Van Meel JCA, Pfaffendorf M, Zhang JS, Van Zwieten PA. Endothelium-dependent, nitric oxide-mediated inhibition of angiotensin II-induced contractions in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1994; 262: 247-53.
8. Boulanger CM, Caputo L, Levy BI. Endothelial AT₁-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. *Hypertension* 1995; 26: 752-7.
9. Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxinitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C214-20.
10. Forstermann U, Neufang B. The endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta: effects of antioxidants and hydroxylated eicosatetraenoic acids. *Br J Pharmacol* 1984; 82: 765-7.
11. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1995; 38: 105-28.
12. Kiowski W. Endothelial dysfunction in hypertension. *Clin and Exper Hypertension* 1999; 21: 635-46.
13. Vanhoutte PM, Miller VM. α_2 -adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med* 1989; 87: 1S-5S.
14. Sheperd JT, Vanhoutte PM. Local modulation of adrenergic neurotransmission. *Circulation* 1981; 64:655-66.
15. Zimmerman BG, Kraft E. Blockade by saralasin of adrenergic potentiation induced by renin angiotensin system. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 210: 101-5.
16. Palaic D, Khairallah PA. Inhibition of noradrenaline uptake by angiotensin. *J Pharm Pharmacol* 1970; 22: 37-41.
17. Privat C, Lantoine F, Bedioui F, Millanvoye van Brussel E, Devynck J, Devynck MA. Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sciences* 1997; 61: 1193-202.
18. Seyedi N, Xu XB, Nasjletti A, Hintze TH. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 1995; 26: 164-70.
19. Zhang X, Nasjletti A, Xu X, Hintze TH. Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme inhibitors increase nitric oxide production in isolated canine coronary microvessels by a kinin-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 623-9.
20. Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky S, Moore LC. AT₁ receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 220-4.
21. Kai H, Fukui T, Lassegue B, Shah A, Minieri CA, Griending KK. Prolonged exposure to agonists results in a reduction in the levels of the Gq/G11 alpha subunits in cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 96-104.
22. Shimuta SI, Kanashiro CA, Ferreira AT, Oshiro ME, Paiva

- TB, Paiva AC. Role of Na⁺ and protein kinase C in angiotensin desensitization and tachyphylaxis in the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347:425-31.
23. Guan H, Cachofeiro V, Pucci ML, Kaminski PM, Wolin MS, Nasjletti A. Nitric oxide and the depressor response to angiotensin blockade in hypertension. *Hypertension* 1996; 27:19-24.
 24. Cachofeiro V, Guan H, Nasjletti A. Contribution of nitric oxide to the antihypertensive effect of blockers of AT₁ angiotensin receptors in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19:1247-61.
 25. Cachofeiro V, Maeso R, Muñoz-García R, Lahera V. The potential role of nitric oxide in angiotensin II-receptor blockade. *Blood Press Suppl* 1996; 2:29-35.
 26. Maeso R, Navarro-Cid J, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V. Differential effects of losartan and doxazosin on vascular function in senescent spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999; 12:1105-8.
 27. Wiemer G, Scholkens BA, Busse R, Wagner A, Heitsch H, Linz W. The functional role of angiotensin II subtype AT₂-receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *Pharm Pharmacol Lett* 1993; 3:24-7.
 28. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000; 14:271-8.
 29. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw R, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:1141-48.

Among the questions that a health worker should ask when planning a survey or study is "How large a sample do I need?" The answer will depend on the aims, nature and scope of the study and on the expected result, all of which should be carefully considered at the planning stage. For example, in a study of the curative effect of a drug on a fatal disease such as the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), where a single positive result could be important, sample size might be considered irrelevant. In contrast, if a new malaria vaccine is to be tested, the number of subjects studied will have to be sufficiently large to permit comparison of the vaccine's effects with those of existing preventive measures.

Entre las preguntas que un investigador de salud debería plantearse cuando planea una encuesta o un estudio, figura la siguiente: "¿qué tamaño de muestra necesito?" La respuesta dependerá de los objetivos, la naturaleza y el campo del estudio y del resultado esperado, los cuales deben considerarse cuidadosamente en la etapa de planificación. Por ejemplo, en un estudio sobre el efecto curativo de una droga sobre un síndrome fatal, tal como el SIDA, en donde un solo resultado positivo podría ser importante, el tamaño de la muestra podría considerarse irrelevante. En contraste, si se ensayara una nueva vacuna contra la malaria, el número de sujetos estudiados deberá ser suficientemente grande como para permitir comparar los efectos de la vacuna con los de las medidas preventivas ya existentes.

S.K. Lwanga, S. Lemeshow

Sample size determination in health studies. A practical manual.
Geneva: World Health Organization, 1991, p vii