

MODULACION POR EL ENDOTELIO DE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR DISTINTOS AGONISTAS ALFA-ADRENERGICOS EN LA AORTA DE RATA

Verde, I.; Loza, M.; Gil-Longo, J.; Campos, M.; Orallo, F.; Calleja, M.J.

Dpto de Farmacología, Farmacia y Tecnología farmacéutica. Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia. Santiago de Compostela. Spain.

INTRODUCCION

Desde que Furchgott (5), (6) descubrió que la presencia de endotelio es imprescindible para la acción relajante vascular de la acetilcolina, han aparecido múltiples estudios que demuestran que las células endoteliales pueden desempeñar un papel decisivo en la modulación de determinados procesos biológicos, como por ejemplo, el tono vascular (1), (9), (13), (15) y los efectos de distintos fármacos (1), (14). Es más, se ha descrito la presencia de receptores alfa₂ en el endotelio vascular cuya activación puede estimular la liberación de EDRF (3), (4).

Con el objeto de confirmar la presencia de dichos receptores, en el presente trabajo se estudia la posible modulación por el endotelio de las contracciones inducidas por distintos agonistas alfa-adrenérgicos en la aorta de rata.

METODOS

Aorta torácica de rata

Los experimentos fueron realizados con ratas Sprague-Dawley hembras de 250-350 g de peso, las cuales se sacrificaron por traumatismo retrocervical y arteriotomía carotídea. Tras el sacrificio se practicó una toracolaparatomía media con el fin de extraer el segmento de la aorta torácica descendente, el cual, una vez limpio de tejido conectivo adyacente y convenientemente cortado en anillos de 4 mm de longitud, cuya cara íntima fue frotada en algunas ocasiones con una fina varilla de madera para eliminar las células endoteliales, se introdujo inmediatamente bajo una tensión de 1,3 gramos en un baño de órganos de 20 ml con solución de Krebs (composición mM: NaCl 118.07; KCl, 4; CaCl₂·2H₂O, 2.5; MgSO₄ 7H₂O, 1.2; KPO₄H₂, 1.2; NaCO₃H, 25; glucosa, 11) mantenida a 37°C, y con burbujeo continuo de carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂). Las contracciones se registraron mediante transductores isométricos CPOL 0-25 g conectados a un equipo semiautomático Celaster IOS-1. Después de un período de estabilización de 1h, con intervalos de lavado de 15 minutos, se comprobó inicialmente la presencia o ausencia de endotelio observando la relajación producida por una dosis acetilcolina (10 µM) sobre la contracción evocada por noradrenalina (1mM).

A continuación, en algunos experimentos se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de los agonistas utilizados: noradrenalina (0.1 nM-10 µM), metoxamina (10 nM-0.1 mM), y BHT-920 (10 nM-0.1 mM) por el procedimiento de dosis acumulativas descrito por Van Rossum (16), haciendo las adiciones correspondientes después de haber alcanzado contracciones estables con cada dosis. Una vez registradas dos curvas control similares (con agonista sólo), dejando siempre recuperar la línea base inicial entre dos curvas para reducir al máximo la posible desensibilización de los receptores, se introdujo en la copa de tejidos una determinada concentración de azul de metileno 15 minutos antes de la construcción de una nueva curva.

En otros experimentos se provocó la contracción con una dosis de KCl (60 mM), sin ajustar la osmolaridad del medio, durante aproximadamente 30 minutos, suficientes para obtener una

contracción estable, y a continuación se adicionaron a la copa dosis acumulativas de BHT-920, observándose el efecto de cada una de ellas durante 5 minutos.

Expresión y análisis de resultados

Cada uno de los datos que aparecen en los resultados representa el valor medio \pm error estándar.

El efecto relajante del BHT-920 se expresó en función de la CI_{50} ó concentración necesaria para provocar el 50% de relajación de la contracción correspondiente.

La relajación producida por la acetilcolina se expresó en % de relajación producida sobre una contracción evocada por noradrenalina.

El análisis estadístico de comparación entre medias en curvas concentración-respuesta con y sin preincubación de azul de metileno se realizó mediante el test t de Student para datos apareados. Mientras que para comparar medias entre curvas concentración-respuesta con y sin presencia de células endoteliales se realizó mediante el test t de student para datos agrupados. Ambos test consideran que la diferencia es significativa cuando $P < 0.05$.

Fármacos y reactivos

Los fármacos utilizados fueron los siguientes:

Bitartrato de (-) noradrenalina (Sigma), agonista α_1 y α_2 ; clorhidrato de metoxamina (Gayoso Wellcome S.A.), agonista α_1 ; BHT-920 (Boehringer Ingelheim), agonista α_2 ; clorhidrato de acetilcolina (Sigma); azul de metileno (Merck).

Las disoluciones de noradrenalina se prepararon diariamente con agua desionizada a partir de una disolución concentrada (0,1 M) conservada a -20°C y con bisulfito sódico al 0,2% para prevenir la oxidación, pocos minutos antes de ser utilizadas.

Las disoluciones de metoxamina, BHT-920, y acetilcolina, se prepararon también a partir de disoluciones madre (0.1 M) conservadas a -20°C , pocos minutos antes de ser utilizadas.

Las disoluciones de azul de metileno se prepararon diariamente con disoluciones stock (0.01 M) con agua desionizada y conservadas a -20°C .

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS

1) Curvas concentración-respuesta.

Sin endotelio

La noradrenalina y metoxamina se comportaron como agonistas totales en la aorta de rata, produciendo contracciones dosis-dependientes de su musculatura lisa. Por otro lado, el BHT-920 se comportó como agonista parcial. Las tensiones (mg) máximas evocadas fueron: noradrenalina 3502 ± 814 ($n=4$); metoxamina 3522 ± 191 ($n=4$); BHT-920 2206 ± 250 ($n=4$).

En preparaciones preincubadas con azul de metileno las curvas concentración-respuesta de cada agonista no se modificaron significativamente (figuras 1, 2 y 3).

Con endotelio

La acetilcolina ($10 \mu\text{M}$) relajó las contracciones evocadas por noradrenalina ($1 \mu\text{M}$) en un 35.63 ± 4.3 % de la tensión máxima alcanzada.

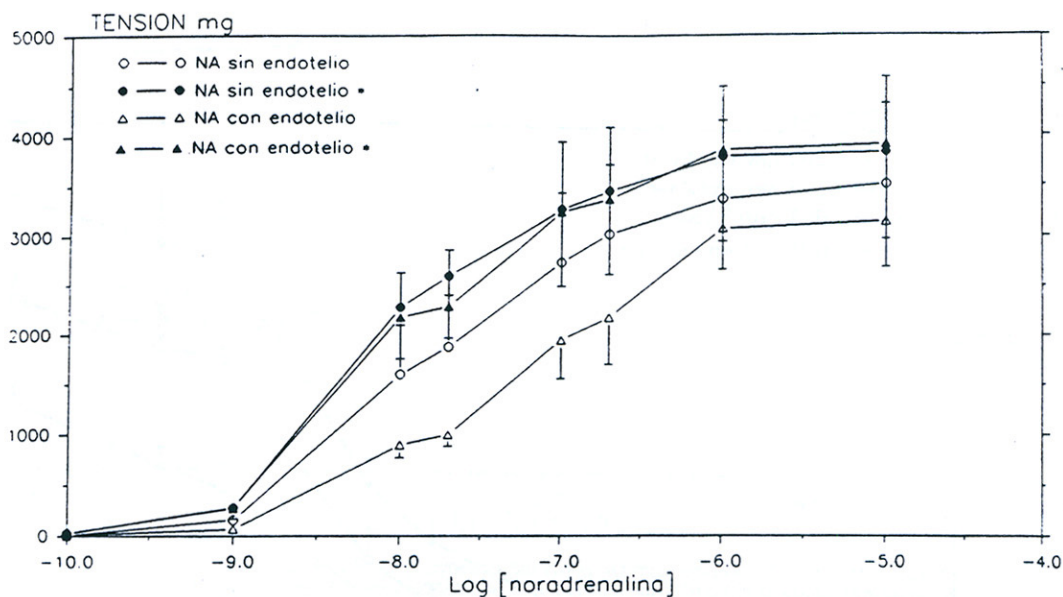


FIGURA 1. Curvas concentración-respuesta de noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio y en ausencia o en presencia (*) de azul de metileno. Cada punto representa el valor medio \pm e.e.m. de 4 experimentos.

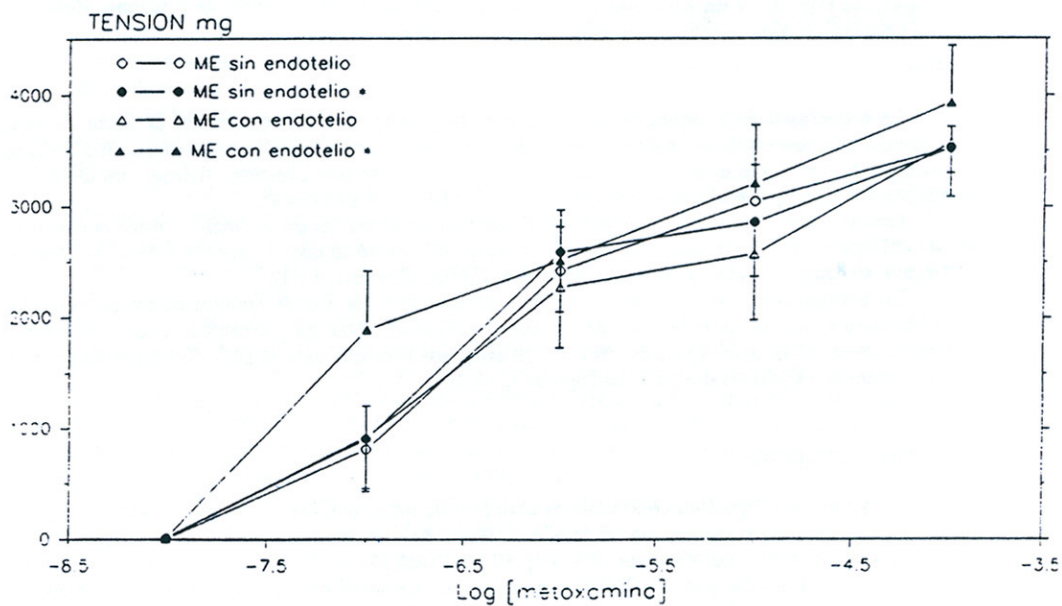


FIGURA 2. Curvas concentración-respuesta de metoxamina (ME) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio y en ausencia o en presencia (*) de azul de metileno. Cada punto representa el valor medio \pm e.e.m. de 4 experimentos.

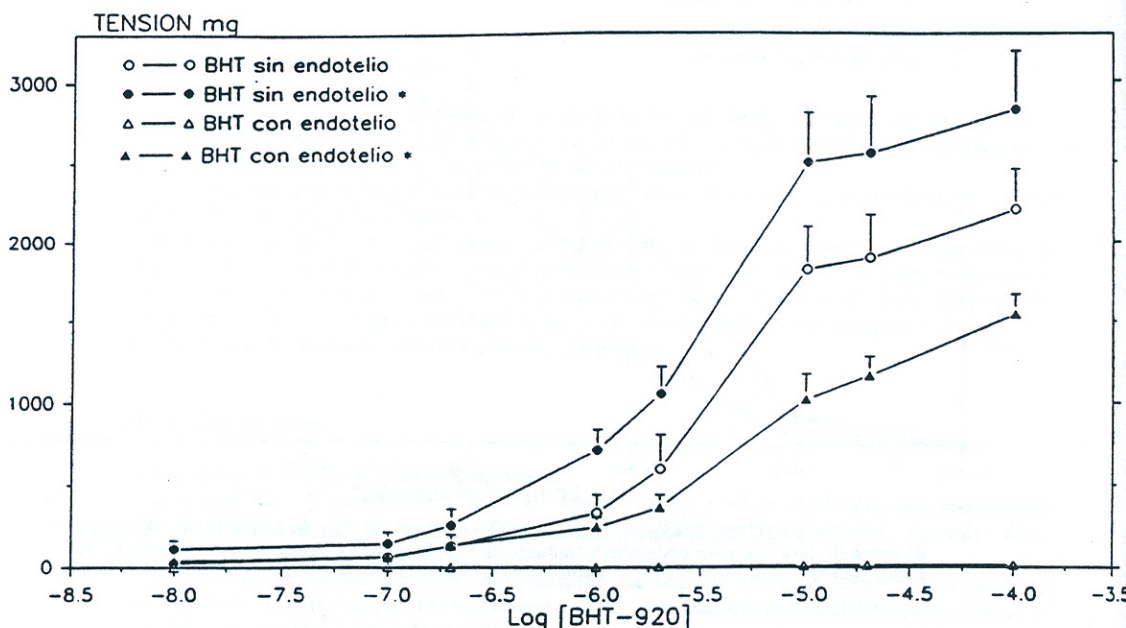


FIGURA 3. Curvas concentración-respuesta de BHT-920 (BHT) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio y en ausencia (*) o en presencia (*) de azul de metileno. Cada punto representa el valor medio \pm e.e.m. de 4 experimentos.

La noradrenalina y metoxamina se comportaron como agonistas totales en la aorta de rata, produciendo contracciones dosis-dependientes de su musculatura lisa. Por otro lado, el BHT-920 se comportó como agonista parcial. Las tensiones (mg) máximas evocadas fueron: noradrenalina 3130 ± 454 ($n=4$); metoxamina 3572 ± 889 ($n=4$); BHT-920 199 ± 48 ($n=4$).

Las tensiones fueron significativamente distintas a las obtenidas sin endotelio a dosis mayores de $1 \mu\text{M}$ para BHT-920. Las tensiones evocadas por metoxamina y noradrenalina no fueron significativamente distintas a las obtenidas sin endotelio (figuras 1, 2 y 3).

En preparaciones preincubadas con azul de metileno las curvas concentración-respuesta de metoxamina no se modificaron de forma significativa. Para noradrenalina hubo diferencias significativas a las dosis más bajas (0.1 nM - 10 nM), mientras que para el BHT-920 hubo diferencias significativas a todas las dosis usadas (figuras 1, 2 y 3).

Curvas de relajación

El KCl (60 mM) produjo contracciones tónicas sostenidas, generando una tensión media (mg) de 3724 ± 391 en preparaciones sin endotelio y 4034 ± 305 en preparaciones con endotelio, cuyas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$). El BHT-920 (0.1 mM) relajó ($\text{CI}_{50} = 1.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) las contracciones inducidas por el KCl (figura 4), mientras que noradrenalina y metoxamina no relajaron dichas contracciones. En preparaciones sin endotelio ninguno de los agonistas utilizados provocó relajación de las contracciones evocadas por K^+ (60 mM).

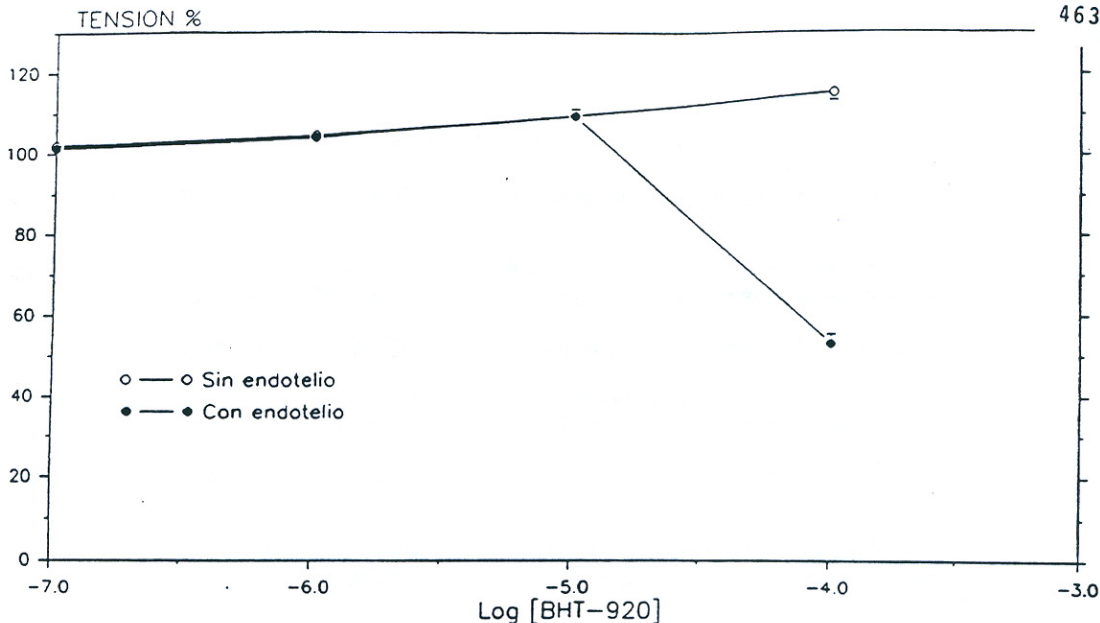


FIGURA 4. Efecto provocado por dosis acumulativas de BHT-920 en anillos de aorta de rata con y sin endotelio contraídas con potasio (60 mM). Cada punto representa el valor medio \pm e.e.m. de 2 experimentos.

DISCUSION

La relajación provocada por la acetilcolina sobre las contracciones inducidas por K^+ en tejidos vasculares con endotelio debido a que modula positivamente la liberación de factor relajante dependiente de endotelio (EDRF) por interacción con receptores muscarínicos, demostrada por Furchgott (5), (6), dió lugar a múltiples estudios que demuestran el papel trascendental que el sistema endotelial desempeña en la modulación de determinados procesos biológicos, como por ejemplo, el tono vascular (9), (13), (14), (15).

Así, se ha descrito la existencia de adrenoceptores α_2 en el endotelio vascular cuya activación puede estimular la liberación de EDRF (2), (4), (8), (11), sustancia que puede modificar los efectos vasculares de distintos fármacos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el BHT-920, agonista adrenérgico selectivo de los receptores α_2 , manifiesta un comportamiento idéntico al de la acetilcolina, esto es, relaja las contracciones inducidas por altas concentraciones de K^+ en tejidos intactos pero no en tejidos raspados (desprovistos de endotelio), mientras que la metoxamina (agonista α_2 selectivo) y la noradrenalina (agonista mixto, α_1 y α_2) no tienen efectos significativos sobre esas contracciones.

Por otro lado, nuestros resultados también demuestran que las células endoteliales desempeñan un importante papel en la modulación de las contracciones inducidas por BHT-920, pero no en las evocadas por metoxamina o noradrenalina. En efecto, resulta evidente la pérdida de tensión máxima generada por el BHT-920 en tejidos intactos, tensión que recupera sus valores normales, semejantes a los obtenidos en preparaciones raspadas, cuando los tejidos se preincuban con azul de metileno, un potente inhibidor de la guanilato-ciclasa (7), (10), (12).

Todos estos datos sugieren de forma clara la existencia de receptores adrenérgicos α_2 endoteliales cuya activación modula positivamente la liberación del factor relajante endotelial (EDRF).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Xunta de Galicia la financiación parcial de este trabajo. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a los laboratorios Gayoso Wellcome y Boehringer Ingelheim por su amabilidad al habernos suministrado la metoxamina y el BHT-920.

BIBLIOGRAFIA

1. Angus, J.A.; Cocks, T.M.. *Endothelium derived relaxing factor*. Pharmac. Ther. 1989; 41: 303-352.
2. Carrier, G.O.; White, R.E.. *Enhancement of α_1 and α_2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium of aorta*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1985; 232: 682-687.
3. Davey, M.J.. *Overview of alpha receptors*. Clin. Sci. 1986; 70 (suppl 14): 335-395.
4. Egleme, T.; Godfraind, T.; Miller, R.C.. *Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells*. Br. J. Pharmacol. 1984; 81: 16-18.
5. Furchgott, R.F.. *Interactions of endothelial cells and smooth muscle of arteries*. Chest 1985; 88: 2105-2135.
6. Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V.. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature 1980; 288: 373-376.
7. Godfraind, T.. *Pharmacology of calcium metabolism in smooth muscle*. Calcium in drug actions. Baker, P.S.. Springer-Verlag. Berlín. 1988; 361-381.
8. Godfraind, T.; Egleme, T.; Alosachie, I.. *Role of endothelium in the contractile response of rat aorta of α -adrenoceptor agonist*. Clin. Sci. 1985; 68 (suppl 10): 655-715.
9. Luscher, T.F.; Vanhoutte, P.M.. *Endothelium dependent responses in human blood vessels*. Trends. Pharmacol. Sci. 1988; 9: 181-184.
10. Malta, E.; Schini, V.; Miller, R.C.. *Effect of endothelium on basal and α -adrenoceptor stimulated calcium fluxes in rat aorta*. Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1986; 334: 63-70.
11. Miller, R.C.; Mony, M.; Schini, V.; Schoeffter, P.; Stoclet, J.C.. *Endothelial mediated inhibition of contraction and increase in cyclic GMP levels evoked by the α -adrenoceptor agonist BHT-920 in rat isolated aorta*. Br. J. Pharmacol. 1984; 83: 903-908.
12. Miller, R.C.; Stoclet, J.C.. *Modulation by endothelium of contractile responses in rat aorta in absence and presence of flunarizine*. Br. J. Pharmacol. 1985; 86: 655-661.
13. Orallo, F.. *Papel del endotelio en la recaptación neuronal de [3H] noradrenalina y en el influjo de ^{45}Ca en anillos de aorta de rata*. Proc. del XVIII congreso internacional de la Sociedad farmacéutica del Mediterraneo Latino, 1988; Roma en prensa.
14. Vanhoutte, P.M.. *Endothelium and control of vascular function*. Hypertension 1989; 13: 658-667.
15. Vanhoutte, P.M.; Katusic, Z.S.. *Endothelium derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anión*. Trends. Pharmacol. Sci. 1988; 9: 229-230.
16. Van Rossum, J.M.. *Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters*. Arch. Int. Pharmacol. 1963; 143: 299-330.