

EFFECTOS DE LA GLAUCINA SOBRE LAS CONTRACCIONES Y EL INFLUJO DE ^{45}Ca INDUCIDO POR NORADRENALINA Y K^+ EN LA AORTA DE RATA.

Orallo F.; Loza M.; Gil J.; Verde I.; Cadavid I.; Calleja J.M.

Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia. Santiago de Compostela. Spain.

INTRODUCCION.

La glaucina es un alcaloide aislado del *Glaucium flavum* Crantz (1). Se conocen sus efectos sobre varios neurotransmisores centrales (2), su acción neuroendocrina (3), y sus propiedades relajantes musculares, atribuidas al efecto inhibidor de la fosfodiesterasa del 3'-5' AMPc, aunque algunos autores (4) sugieren que este mecanismo no es suficiente para justificar su efecto relajante a nivel del músculo liso.

Con objeto de aportar nuevos datos que contribuyan a esclarecer este mecanismo, en el presente trabajo se realiza un estudio de los efectos de la glaucina sobre las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) y K^+ en anillos de aorta de rata, y sobre el influjo de ^{45}Ca basal y evocado por los dos agentes vasoconstrictores.

MATERIAL Y METODOS.

Experimentos de contractilidad.

Se realizaron con ratas Sprague-Dawley de 250-350 g sacrificadas por traumatismo retrocervical y arteriotomía carotídea. Por toracolaparatomía media se obtuvo un segmento de aorta descendente que, tras separación del tejido conectivo, fue cortada en anillos de 4 mm de longitud cuya cara íntima se frotó con una varilla de madera para destruir el endotelio. Estos anillos se montaron, sometidos a 1,3 g de tensión, en una copa de órgano aislado con 20 ml de solución de Krebs (composición mM: NaCl, 118,07; KCl, 4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 , 25; Glucosa 11) a 37°C y burbujeada con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). Las contracciones isométricas se registraron mediante un transductor CPOL 0-25 g conectado a un equipo Celaster IOS-1.

Tras 60 minutos de estabilización, con intervalos de lavado de 15 minutos, los anillos fueron contraídos con NA (10 μM) ó KCl (60 mM) hasta contracción estable, añadiéndose a continuación dosis acumulativas de glaucina cada 10 minutos.

Para los ensayos realizados en medio sin calcio (0Ca), tras una hora de estabilización en Krebs se cambió a Krebs 0Ca (preparado como se indicó anteriormente, pero sustituyendo el CaCl_2 por EGTA 0,5 mM) durante 10 minutos administrando, a continuación, una dosis 1 μM de NA. Tras obtener la respuesta fásica y tónica se incubó durante un periodo de 20 minutos en Krebs para relleno de los depósitos, volviendo a Krebs 0Ca 10 minutos y aplicando una nueva dosis de NA. Este protocolo se repitió hasta la obtención de dos respuestas iguales (controles), en este momento se administró glaucina 10 μM en el periodo de lavado con Krebs 0Ca (10 minutos) repitiéndose la contracción con NA.

Influjo de ^{45}Ca .

Los anillos de aorta obtenidos por el método anterior se colocaron en una solución fisiológica (composición mM: NaCl, 139; KCl, 5; MgCl_2 , 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5; HEPES, 5; glucosa, 10) mantenida a 37°C, y con burbujeo continuo de oxígeno.

Tras una hora de estabilización, los tejidos se incubaron en un medio con 0,6 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de ^{45}Ca (New England Nuclear, actividad específica 35,12 mCi/ml) en ausencia (captación basal) o en presencia de KCl (60 mM) o NA (10 μM) durante 5 minutos (captación evocada). Para estudiar la influencia de la glaucina (0,3 mM) sobre estas captaciones, los anillos se pusieron en contacto con el alcaloide 20 minutos antes y durante el periodo de incubación con ^{45}Ca . A continuación los anillos se lavaron durante 5 minutos en 500 ml de una solución de La^{3+} (composición mM: NaCl, 118; KCl, 5,9; Tris hidroximetilaminometano, 5,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2; LaCl_3 , 50) mantenida a 37°C, y ajustada a pH 6,8. Posteriormente, los tejidos fueron secados, pesados y digeridos con 1 ml de H_2O_2 a 115 - 118 °C durante 90 min; tras esta digestión se añadieron 5 ml de cocktail de centelleo Ready-Safe Beckman y se determinó la radiactividad de las muestras en un contador de centelleo Beckman mod LS 3801.

Expresión y análisis estadístico de los resultados.

Cada uno de los datos representa el valor medio \pm el error estándar.

El efecto relajante de la glaucina se expresó como CI_{50} o contracción necesaria para provocar un 50% de relajación de la contracción correspondiente.

En medio libre de calcio, la diferencia entre las respuestas a NA en ausencia y presencia de glaucina, con respecto a la respuesta de NA, se expresa como porcentaje de inhibición.

La captación por el tejido vascular se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula

$$^{45}\text{Ca} \text{ (nmol/kg tejido húmedo)} = \frac{\text{cpm en tejido}}{\text{Kg tejido húmedo}} \cdot \frac{\text{nmol } ^{45}\text{Ca/l}}{\text{cpm/l}}$$

El análisis estadístico de comparación entre medias se realizó mediante el t test de Student para datos apareados o no apareados, test bilateral, considerando que la diferencia es significativa cuando $p < 0,05$.

Reactivos.

La (+)glaucina fué proporcionada por el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química (Universidad de Santiago), las disoluciones se obtuvieron a partir de una solución concentrada (10 mM) conservada a -20°C .

Las disoluciones de NA se obtuvieron a partir de una solución 100 mM conservada a -20°C con bisulfito sódico al 1% para prevenir la oxidación.

Los demás compuestos fueron de grado analítico.

RESULTADOS

Reactividad vascular en Krebs normal.

La NA $10 \mu\text{M}$ y el KCl 60 mM produjeron contracciones tónicas sostenidas en la aorta de rata, generando tensiones de $2123,83 \pm 236,81 \text{ mg}$ y $2206,17 \pm 185,53 \text{ mg}$ respectivamente ($n=5$), la glaucina ($10 \mu\text{M}$ - $0,3 \text{ mM}$) relajó de forma casi equipotente las contracciones inducidas por ambos agentes vasoconstrictores (Fig. 1), siendo los valores de las CI_{50} de $0,068 \pm 0,015 \text{ mM}$ y de $0,14 \pm 0,017 \text{ mM}$, respectivamente, ambos valores no presentaron diferencias significativas.

Reactividad vascular en medio exento de calcio.

La NA ($1 \mu\text{M}$) produjo una contracción caracterizada por un componente fásico inicial y rápido (tensión $1342,75 \pm 104,43 \text{ mg}$; $n=6$) que decayó hasta una tensión tónica mantenida de $307,75 \pm 18,27 \text{ mg}$. La glaucina $10 \mu\text{M}$ inhibió ambos componentes de la contracción, en un 34,14 % y 31,42% respectivamente ($n=5$ $p < 0,05$) (Fig. 2).

Captación de ^{45}Ca .

Noradrenalina.

Los anillos de aorta mostraron una captación basal de $8,97 \pm 0,39 \text{ nmol/Kg}$, $n=10$. La noradrenalina produjo un incremento del flujo de entrada de calcio (captación de ^{45}Ca) con respecto a los tejidos control (contenido tisular de ^{45}Ca : $12,21 \pm 0,50 \text{ nmol/Kg}$, $n=10$) $p < 0,01$ (Fig. 3)

Este incremento en la captación de ^{45}Ca evocado por NA fué inhibido por glaucina hasta un valor del contenido tisular de ^{45}Ca de $9,14 \pm 0,49 \text{ nmol/Kg}$ ($n=6$), que no presenta diferencia significativa con la captación basal mostrada por los anillos de aorta en ausencia del contracturante. La reducción es de un 97,7%. Sin embargo, el alcaloide no modificó significativamente dicha captación basal (contenido tisular de ^{45}Ca : $9,28 \pm 0,29 \text{ nmol/Kg}$, $n=6$)

Potasio.

Los anillos mostraron una captación basal de $9,09 \pm 0,42 \text{ nmol/Kg}$, $n=10$. El K^+ produjo una captación evocada de $16,28 \pm 0,63 \text{ nmol/Kg}$, $n=10$ existiendo entre ambos diferencia significativa ($p < 0,01$).

Este incremento también fué inhibido por glaucina hasta un valor que no presenta diferencia significativa con la captación basal presentada por los anillos de aorta (contenido tisular de ^{45}Ca : $9,08 \pm 0,64 \text{ nmol/Kg}$, $n=6$) La reducción fué del 100%. Cuando se administró en ausencia de K^+ el alcaloide no alteró esta captación basal (contenido tisular de ^{45}Ca : $9,41 \pm 0,63 \text{ nmol/Kg}$, $n=6$).

DISCUSION

La contracción producida por la interacción de la noradrenalina con los adrenoceptores α_1 postsinápticos presentes en aorta de rata se compone de dos fases: una fase inicial rápida, atribuida a la liberación de calcio de sus depósitos intracelulares y una fase lenta sostenida, debida al flujo de entrada de calcio por la apertura de canales operados por receptor. (5), (6).

Sin embargo, el K^+ produce una contracción tónica sostenida en el mismo tejido por despolarización de sus células musculares lisas e influjo de calcio a través de canales voltaje dependientes del tipo L y T (7), (8), (9), (10).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que se requieren concentraciones prácticamente similares de glaucina para relajar casi por completo las contracciones inducidas tanto por K^+ como por NA, aunque es preciso tener en cuenta que las curvas de relajación son distintas y las CI_{50} se encuentran en el límite de la confiabilidad estadística. Estos efectos pueden deberse a una acción intracelular del fármaco y, posiblemente también, a una acción poco selectiva sobre la membrana celular, inhibiendo el flujo de entrada de calcio a través de los canales lentos dependientes de potencial y operados por receptor.

La acción de la glaucina sobre los canales de calcio queda evidenciada en los experimentos realizados con ^{45}Ca en los que se demuestra que no modifica la captación basal y, por tanto, el flujo de entrada de calcio a través de los canales de fuga (11) pero es capaz de inhibir notablemente la captación evocada por noradrenalina y potasio lo que sugiere que la glaucina bloquea no selectivamente el influjo de calcio a través de los canales voltaje-dependientes y operados por receptor, aunque es preciso tener en cuenta que la concentración de glaucina es elevada y podrían ocurrir fenómenos de inespecificidad.

Por otra parte, la acción intracelular de la glaucina queda demostrada con los experimentos realizados en medio exento de calcio. Se ha descrito que la noradrenalina, en ausencia de calcio extracelular, produce en la aorta de rata una contracción inicial rápida y pasajera, atribuida a una liberación de calcio de sus depósitos intracelulares de almacenamiento que posteriormente decae hasta una tensión sostenida tónica cuyo mecanismo todavía no está esclarecido (6), (12).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la glaucina inhibe significativamente ambos componentes de la contracción por NA en medio 0Ca , lo que sugiere que dicho fármaco actúa también intracelularmente, inhibiendo alguno de los siguientes mecanismos, la liberación de calcio de sus lugares de almacenamiento, favoreciendo el flujo de salida de calcio, impidiendo la interacción del calcio con la maquinaria contráctil, bien actuando directamente sobre ella, o activando la captación de calcio por los depósitos intracelulares. Alguna de estas acciones puede estar mediada por el incremento de los niveles de un segundo mensajero (el AMP_c), incremento que puede ser debido a la inhibición de la actividad enzimática de la fosfodiesterasa, precisamente descrita por otros autores (4).

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT con el N° 60902 22001-5035, 1988.

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Dra. Maria del Carmen Villaverde Cameron-Walker, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago por proporcionarnos la glaucina para este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fischer, Arch. Pharm. 1901. 239, 426.
- 2.- Petkov, V., Yanev, S., Stancheva S., Arch Int Pharmacodyn Ther 1982; 259: 83-92.

3.- Zhelyazkov, D., Marcov, M., Maleva, A., Visheva, N., Mikov, V. 1984; Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica 10: 55-58.

4.- Petkov, V., Stancheva, S. Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica 1980; 6: 43-47.

5.- Putney, J.W. Trends Pharmacol Sci 1987; 8: 481-485.

6.- Karaki, H., Weiss, C.B. LILfe Sci 1988; 42: 111-122.

7.- Bean, B.P. Ann Rev Physiol 1989; 51: 367-384.

8.- Tsien, R.W., Hers, P., McCleskey, E.W., Rosenberg, R.L. Ann Rev Biophys Chem 1987; 16: 265-290.

9.- Bean, B.P., Sturek, M., Puga, A., Hermsneyer, K. Circ Res 1986; 59: 229-235.

10.- Godfrain, T., Govoni, S. Trends Pharmacol Sci. 1989; 10: 298-301.

11.- Hurwitz, L. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1986; 26: 225-258.

12.- Godfraind, T. Kaba. Br J Pharmacol 1969; 36: 549-560.

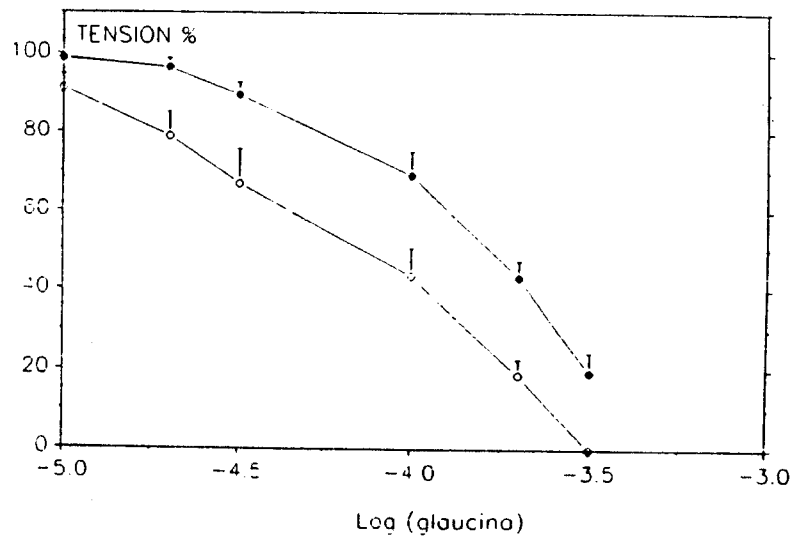


Figura 1.- Representación de las variaciones, provocadas por dosis acumulativas de glaucina, en la tensión contráctil desarrollada por noradrenalina (○) y KCl (●) en anillos de aorta de rata.

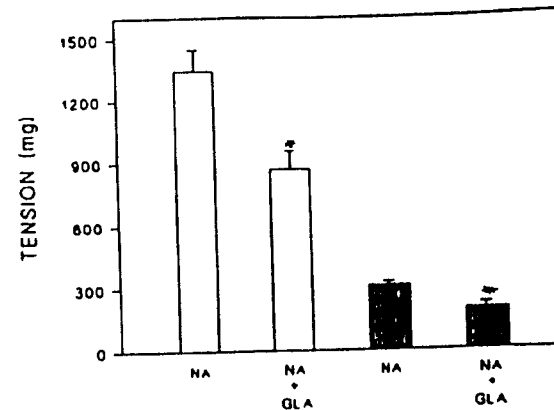


Figura 2.- Representación gráfica de los valores medios de la tensión desarrollada, en medio 0Ca, por noradrenalina en ausencia y presencia de glaucina 10 μ m. Contracción fásica (□), contracción tónica (■). Las líneas verticales representan el error standard. *p<0.05.

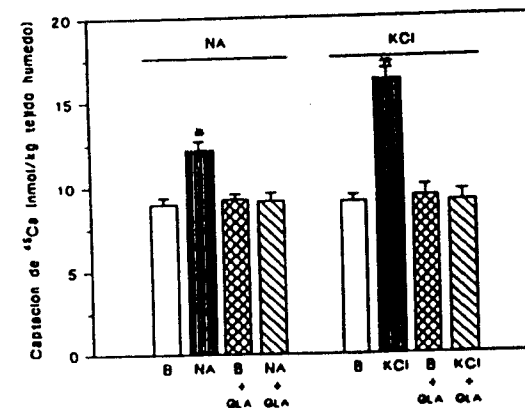


Figura 3.- Representación gráfica de los valores medios de captación de ⁴⁵Ca basal (B), en presencia de noradrenalina 10 μ m (NA), potasio 60 mM (KCl), y glaucina (0,3 mM) (GLA) en las distintas condiciones experimentales.