

EFFECTO DEL ENDOTELIO SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NORADRENALINA Y K^+ EN LAS AORTAS DE RATA GENETICAMENTE HIPERTENSA Y RATA NORMOTENSA.

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

Dpto de Farmacología, Farmacia, y Tecnología Farmacéutica.

Universidad de Santiago de Compostela. España.

INTRODUCCION

Desde que Furchgott (1, 2) descubrió que la presencia de endotelio era imprescindible para la acción relajante vascular de la acetilcolina, han aparecido diversos y variados estudios que demuestran su participación en la relajación provocada por diversos agentes (ATP, serotonina, histamina,...)(3, 4, 5, 6). Es mas, se han descrito diversos mecanismos en células del endotelio vascular que, al ser activados, pueden estimular la liberación de varios factores endoteliales (7). También se ha demostrado la existencia de una posible disfunción o mal funcionamiento del sistema endotelial en procesos de hipertensión, debido, bien a una dificultad en la liberación de EDRF (endothelium derived relaxing factor)(8), o bien a un aumento en la liberación de EDCF (endothelium derived contracting factor)(9, 10).

Con el objeto de confirmar la influencia de los procesos de hipertensión sobre el estado del endotelio, en el presente trabajo se estudia la posible modulación por el sistema endotelial de las contracciones inducidas por noradrenalina y $CaCl_2$ (en medio despolarizante) en aorta de rata normotensa e hipertensa.

EXPERIMENTOS DE CONTRACTILIDAD.

Los experimentos fueron realizados con ratas Wistar Kyoto (WKY) de 245 ± 32 g y Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) de 212 ± 36 g de peso. Antes de ser sacrificadas se comprobó el peso del animal y su presión arterial sistólica en cola, utilizando el método descrito previamente (21). Las ratas fueron sacrificadas por traumatismo retrocervical y arteriotomía carotídea. Tras el sacrificio se practicó una toracotomía 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 un fino hilo de algodón para eliminar las células endoteliales, se introdujo inmediatamente bajo una tensión de 2 gramos en un baño de órganos de 20 ml con solución de Krebs (composición mM: NaCl 119; KCl, 4.7; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2; KPO_4H_2 , 1.2; $NaCO_3H$, 25; glucosa, 11; ácido ascórbico, 0.567; EDTA, 0.03) mantenida a $37^\circ C$, y con burbujeo continuo de carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2). 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 de acetilcolina ($10 \mu M$) sobre la contracción evocada por noradrenalina ($10 \mu M$).

Curvas concentración-respuesta con noradrenalina.

Las curvas concentración-respuesta de noradrenalina (0.1 nM- $10 \mu M$) se obtuvieron por el procedimiento de dosis acumulativas descrito por Van Rossum (20), haciendo las adiciones correspondientes después de haber alcanzado contracciones estables con cada dosis. Se registraron 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, con el objeto de comprobar la reproductibilidad de las mismas.

Curvas en medio libre de calcio.

Para la realización de curvas de CaCl_2 (10 μM -30 mM) se utilizaron medios despolarizantes que se prepararon suprimiendo el calcio del medio y sustituyendo equimolarmente NaCl por KCl (15 y 50 mM). El procedimiento seguido fué igual al utilizado para la realización de las curvas concentración-respuesta de noradrenalina, haciendo la salvedad de que ahora el agente vasoconstrictor es distinto.

EXPRESION Y ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

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

La relajación producida por la acetilcolina se expresó en % de relajación producida sobre una contracción evocada por noradrenalina (10 μM) a la que se le asignó un valor del 100 %.

El análisis estadístico de comparación entre medias en curvas concentración-respuesta con y sin endotelio se realizó mediante el test t de Student para datos agrupados, que también se utilizó para comparar medias entre curvas concentración-respuesta en ratas normotensas e hipertensas. Dicho test considera que la diferencia es significativa cuando $P < 0.05$.

FARMACOS Y REACTIVOS

Los fármacos utilizados fueron los siguientes:

Bitartrato de (-) noradrenalina (Sigma), agonista α_1 y α_2 ; clorhidrato de acetilcolina (Sigma).

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 CaCl_2 se prepararon también a partir de disoluciones madre (3 M) almacenadas a -20°C , pocos minutos antes de ser utilizadas.

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS

La presión arterial sistólica medida en la cola de los animales fué de 115 ± 7 mm Hg en las ratas normotensas, y de 191 ± 8 mm Hg en las hipertensas ($P < 0.01$, $n=30$).

Con el objeto de controlar el estado de endotelio vascular, antes de realizar las curvas, se comprobó el efecto de la acetilcolina (10 μM) sobre una contracción evocada por noradrenalina (10 μM), dando como resultado la siguientes relajaciones (% con respecto a la tensión máxima, $n=15$):

NORMOTENSA CON ENDOTELIO	NORMOTENSA SIN ENDOTELIO	HIPERTENSA CON ENDOTELIO	HIPERTENSA SIN ENDOTELIO
45 \pm 5	1.35 \pm 1	34 \pm 4	1.23 \pm 1

La contracción evocada por noradrenalina fué relajada por la acetilcolina en preparaciones con endotelio en menor proporción ($P < 0.05$) en SHR que en WKY.

Ratas normotensas:

La noradrenalina (0,1 nM-10 μM) se comportó como un agonista total en los anillos de aorta torácica aislada de rata, produciendo contracciones dosis-dependientes de su musculatura lisa (FIGURA 1). Las curvas realizadas en preparaciones con el endotelio intacto ($\text{pD}_2 = 7,75 \pm 0,11$)

estuvieron desplazadas a la derecha con respecto a las que se obtuvieron en preparaciones sin endotelio ($pD_2=8,17\pm0,12$) ($P<0,05$). Aunque la tensión máxima alcanzada en las preparaciones sin endotelio (3424 ± 205 mg) es mayor a la obtenida con endotelio (3244 ± 166 mg), la diferencia entre ambas no es significativa ($P>0,05$, $n=5$) (FIGURA 1).

El $CaCl_2$ ($10\text{ }\mu\text{M}$ - 30 mM) adicionado acumulativamente en un medio parcialmente despolarizante, con 15 mM de K^+ , produjo contracciones dosis-dependientes en anillos de aorta de rata, alcanzándose las tensiones máximas con una concentración de $CaCl_2$ 10 mM (FIGURA 2). En este medio los anillos con endotelio ($pD_2=2,95\pm0,09$) se mostraron menos sensibles al $CaCl_2$ resultando ser la tensión máxima en estas preparaciones (3136 ± 271 mg) significativamente diferente ($P<0,05$, $n=5$) a la obtenida en preparaciones sin endotelio (3748 ± 195 mg) ($pD_2=3,03\pm0,05$).

En los experimentos llevados a cabo en un medio despolarizante, con 50 mM de K^+ , el $CaCl_2$ produjo contracciones dosis-dependientes estando la tensión máxima obtenida en anillos intactos (4002 ± 381 mg) ($pD_2=3,44\pm0,08$) levemente deprimida al compararla con la que se obtuvo en anillos raspados (4264 ± 351 mg) ($pD_2=3,52\pm0,08$), aunque la diferencia no es significativa estadísticamente ($P>0,05$, $n=5$) (FIGURA 3).

Ratas hipertensas:

La noradrenalina ($0,1\text{ nM}$ - $10\text{ }\mu\text{M}$) se comportó como un agonista total en los anillos de aorta de rata, produciendo contracciones dosis-dependientes (FIGURA 1). Las curvas realizadas en preparaciones con el endotelio intacto ($pD_2=8,29\pm0,07$) estuvieron levemente desplazadas a la derecha con respecto a las que se obtuvieron en preparaciones sin endotelio ($pD_2=8,52\pm0,05$) ($P<0,05$, $n=5$).

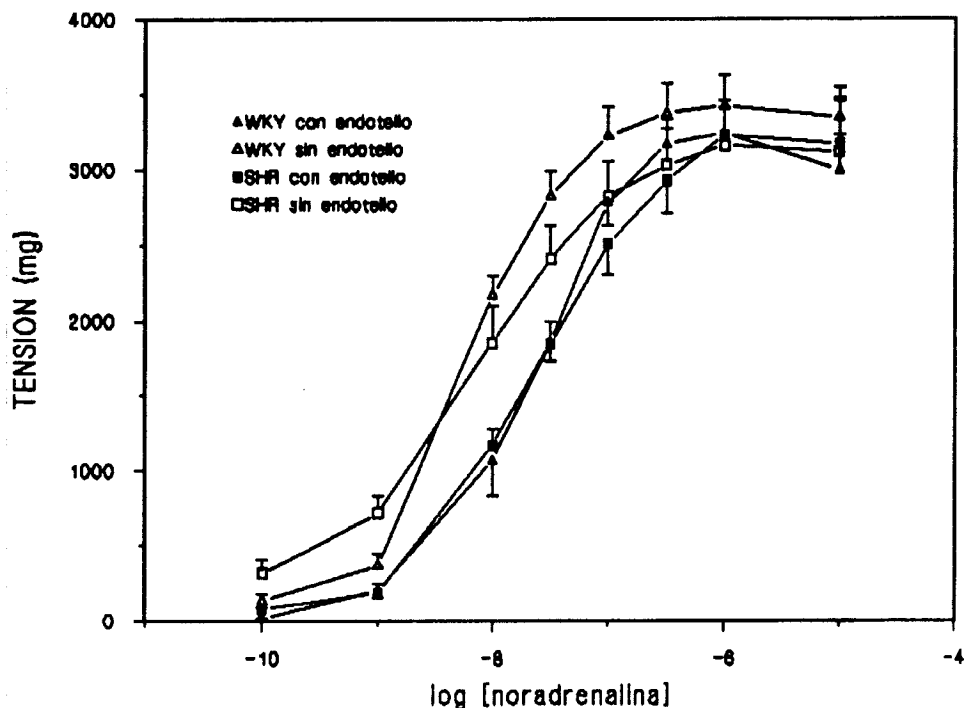


FIGURA 1. Curvas concentración-respuesta de noradrenalina (NA) en anillos intactos y raspados de ratas SHR y WKY. Cada punto representa el valor medio \pm s.e.m. de 5 experimentos.

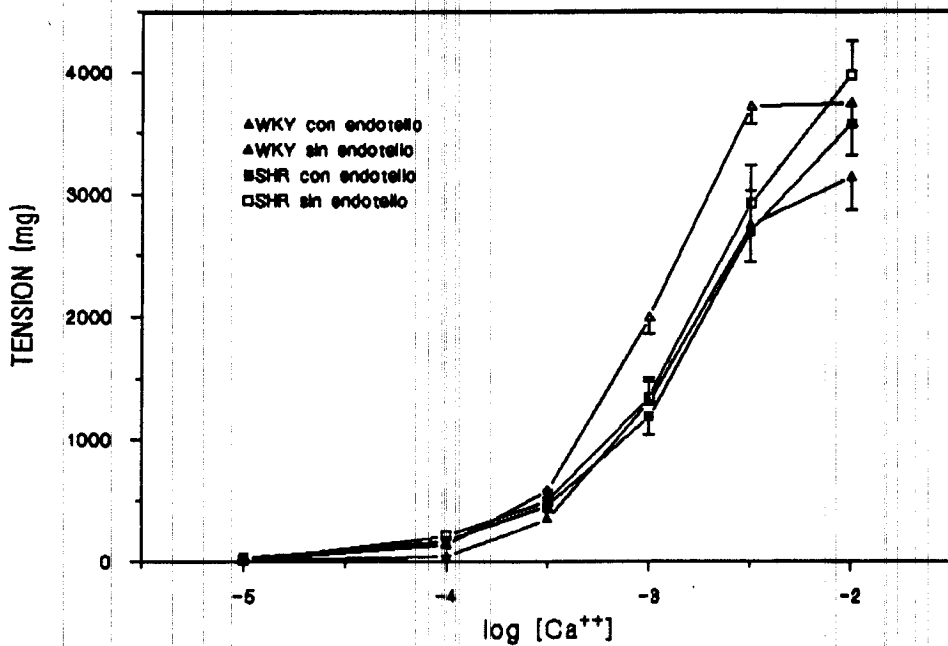


FIGURA 2. Curvas concentración-respuesta de Ca^{++} en medio despolarizante con 15 mM de K^+ en anillos de aorta de rata normo e hipertensa y en presencia y ausencia de endotelio. Cada punto representa el valor medio \pm s.e.m. de 5 experimentos.

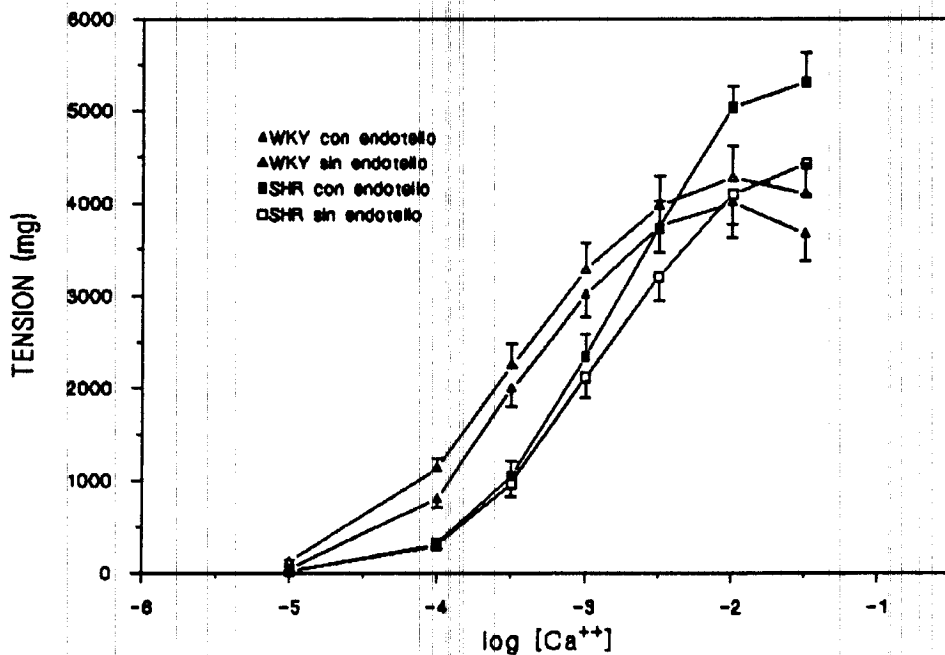


FIGURA 3. Curvas concentración-respuesta de Ca^{++} en medio despolarizante con 50 mM de K^+ en preparaciones de aorta de rata con y sin endotelio. Comparación entre SHR y WKY. Cada punto representa el valor medio \pm s.e.m. de 5 experimentos.

El CaCl_2 ($10 \mu\text{M}$ - 30 mM) adicionado acumulativamente en un medio parcialmente despolarizante, con 15 mM de K^+ , produjo contracciones dosis-dependientes en anillos de aorta de rata, alcanzándose las tensiones máximas con una concentración de CaCl_2 10 mM (FIGURA 2). En este medio las tensiones máximas obtenidas fueron de $3575 \pm 311 \text{ mg}$ en anillos con endotelio ($\text{pD}_2 = 3.25 \pm 0.08$) y de $3973 \pm 284 \text{ mg}$ en preparaciones sin endotelio ($\text{pD}_2 = 3.00 \pm 0.08$), no existiendo diferencias significativas ($P > 0.05$, $n = 5$).

En los experimentos llevados a cabo en un medio despolarizante, con 50 mM de K^+ , el CaCl_2 produjo contracciones dosis-dependientes (FIGURA 3) siendo la tensión máxima en anillos intactos ($5306 \pm 351 \text{ mg}$) ($\text{pD}_2 = 3.41 \pm 0.09$) significativamente mayor ($P < 0.05$, $n = 5$) a la que se produjo en anillos raspados ($4002 \pm 381 \text{ mg}$) ($\text{pD}_2 = 3.44 \pm 0.06$).

DISCUSION

El importante papel, destacado por algunos autores (1, 2, 3), que desempeñan las células endoteliales en la regulación de determinados procesos vasculares, ha inducido a pensar en la participación de varios factores dependientes de endotelio (EDRF, EDCF y EDHF) (3, 4, 5, 11, 12) en dicha regulación. Otros autores han demostrado distintos comportamientos de uno o varios de estos factores endoteliales en estados de hipertensión (8, 9, 13).

Así, algunos investigadores han demostrado la disminución del efecto vasorelajante de la acetilcolina (3, 8, 11, 14, 15,) en determinados estados patológicos (hipertensión y aterosclerosis), efecto estudiado también en ratas normo e hipertensas en el presente trabajo, atribuyéndola a que existe una dificultad en la liberación de EDRF por parte de las células endoteliales en las citadas patologías. También se indicó que podría existir una liberación de diversos factores contracturantes en estos estados, liberación que también se daría en estados normales pero que se vería aumentada en estados de hipertensión.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la presencia de endotelio contribuye al desplazamiento de las curvas de noradrenalina hacia la derecha (7), desplazamiento que, aunque levemente, es menor en ratas hipertensas que en ratas normotensas. Estos resultados han sido explicados por otros autores (10, 14, 15), indicando que existe un menor estímulo en la liberación de EDRF en estados de hipertensión.

Como se puede apreciar al observar las curvas de Ca^{++} en medio 15 mM de K^+ , existe un desplazamiento a la derecha de las curvas con endotelio con depresión del efecto máximo, el cual es menor en SHR que en WKY. Este hecho no se puede explicar debido a un menor estímulo en la liberación de EDRF, ya que en las células endoteliales, según Spedding (1986)(16) y Colden-Stanfield (1987)(17), no existen canales dependientes de voltaje (VOC's), por lo que en este caso no habría entrada de Ca^{++} y, por lo tanto, no se produciría liberación de EDRF, al contrario de lo que ocurre con la noradrenalina, que estimula adrenoreceptores α_2 endoteliales (18, 19). Otros autores han postulado la existencia de un tono basal de EDRF (2), el cual podría estar disminuido en estados de hipertensión. Por otro lado, S. Osagy y Shimamura (1990)(9), indican que se produce una estimulación de EDCF por altas concentraciones de K^+ la cual es mayor en individuos con patología hipertensiva, mientras que Katusic (1988)(15) y Greenberg (1988)(14), entre otros (11, 12), han sugerido también la intervención de EDHF que sería menos notable en estados de hipertensión.

Estos desequilibrios en el metabolismo de los factores endoteliales también serían la causa de que las curvas de Ca^{++} en medio 50 mM de K^+ realizadas en anillos intactos de SHR, estén desplazadas a la izquierda con respecto a las curvas en anillos raspados, fenómeno que no se produce en ratas normotensas.

Todo lo expuesto nos lleva a indicar la existencia de una alteración del sistema endotelial en ratas genéticamente hipertensas (SHR), la cual puede ser debida a un desequilibrio en el metabolismo de uno o varios de los distintos factores, relajantes y contracturantes, dependientes de endotelio, que hace que el comportamiento del músculo liso vascular frente a noradrenalina y K^+ difiera entre SHR y WKY.

BIBLIOGRAFIA

1. **Furchgott RF.** *Interactions of endothelial cells and smooth muscle of arteries.* Chest 1985; 885: 2105-2135.
2. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature 1980; 288: 373-376.
3. **Angus JA, Cocks TM.** Endothelium-derived relaxing factor. Pharmac Ther 1989, 41: 303-352.
4. **Vanhoutte PM.** Endothelium and control of vascular function. Hypertension 1989, 13: 658-667.
5. **Lüscher TF, Vanhoutte PM.** Endothelium dependent responses in human blood vessels. Trends Pharmacol Sci 1988, 9: 181-184.
6. **Lai FM, Cobuzzi A, Shepherd C, Tanikella T, Hoffman A, Cervoni P.** Endothelium-dependent basilar and aortic vascular responses in normotensive and coarctation hypertensive rats. Life sci 1989, 45: 607-614.
7. **Malta E, Schini V, Miller RC.** Effect of endothelium on basal and alfa-adrenoceptor stimulated calcium fluxes in rat aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1986, 334: 63-70.
8. **Watt PAC, Thurston H.** Endothelium dependent relaxation in resistance vessels from SHR. J Hypertension 1989, 7: 661-667.
9. **Osugy S, Shimamura K, Susano S.** Decreased modulation by endothelium of noradrenaline-induced contractions in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Arch Int Pharmacodyn 1990. 305: 86-99.
10. **Marín J.** Factor relajante de origen endotelial (EDRF). En "Nuevos Medicamentos". Ed por Gandía L, Garrido B, García AG, Delgado C. Madrid: Artes Gráficas Grupo, 1990, pg 14-161. endotel 27
11. **Chen G, Suzuki H, Weston AH.** Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. Br J Pharmacol 1988, 95: 1165-1174.
12. **Taylor SG, Weston AH.** Endothelium derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. TIPS 1988, 9: 272-274.
13. **Sim MK, Singh M.** Decreased responsiveness of the aortae of hypertensive rats to acetylcholine, histamine and noradrenaline. BR J Pharmacol 1987, 90: 147-150.
14. **Greenberg S, Diecke FPJ.** Endothelium-derived relaxing factor: new concepts and new findings. Drug Develop Res 1988, 12: 131-149.
15. **Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A-23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries. Stroke 1988, 19: 476-479.
16. **Speding M, Schini V, Schoeffter P, Miller RC.** Calcium channel activation does not increase release of endothelial-derived relaxant factors (EDRF) in rat aorta although tonic release of EDRF may modulate calcium channel activity in smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1986, 8: 1130-1137.
17. **Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL.** Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultures bovine aortic endothelial cells. Circulation Res 1987, 61: 632-640.
18. **Verde I, Loza M, Gil-Longo J, Campos M, Orallo F, Calleja JM.** Modulación por el endotelio de las contracciones inducidas por distintos agonistas alfa-adrenérgicos en la aorta de rata. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. En prensa.
19. **Egleme C, Godfraind T, Miller RC.** Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cell. Br J Pharmacol 1984, 81: 16-18.
20. **Van Rossum JM.** Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. Arch Int Pharmacodyn 1963, 143: 299-230.
21. **Orallo F, Fontenla JA, Loza MI, Campos M, Calleja JM.** Effect of urethane on hydralazine-induced tachycardia in rats. Gen Pharmacol. En prensa.