

¿Regula la acetilcolina la sensibilidad del vaso aislado a la norepinefrina?

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

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

RESUMEN

Furchgott demostró que la acetilcolina depende del endotelio vascular para ejercer su efecto dilatador cuando el vaso se encuentra contraído por norepinefrina (NE). Nosotros hemos comprobado esto y además verificado que el neurotransmisor ejerce una acción constrictora en el vaso aislado que ha sido desprovisto de su endotelio. Esto nos hizo pensar que quizás la incubación del vaso aislado sin endotelio en acetilcolina, podría potenciar la acción constrictora de la NE. Para este estudio utilizamos manguitos aislados de aorta de rata, desprovistos mecánicamente de endotelio, inmersos en solución Krebs-Henseleit (K-H) en pequeño baño de órgano aislado que permitía registrar el tono de las preparaciones mediante transductores de fuerzas y registrarlo en un fisiógrafo Grass. Se ensayaron dosis únicas de NE, 10^{-6} M y también crecientes y acumulativas desde 10^{-7} hasta 10^{-4} M, antes y después de incubar la preparación en acetilcolina; agregando 1 ml de una solución 10^{-3} M al baño. A modo de control, en otra serie experimental, se usó solución K-H para incubar el vaso aislado sin endotelio. Al iniciar y al finalizar los experimentos, se cambió momentáneamente la solución K-H por una despolarizante (K 70) como prueba funcional, porque la preparación responde con una contracción máxima a este estímulo. Contradictoriamente, la preparación sin endotelio que ha sido incubada previamente en acetilcolina, responde con menor intensidad a la acción vasoconstrictora de la NE. En esta situación experimental, con vasos desprovistos de íntima, no podemos invocar a la liberación del factor relajador derivado del endotelio. Presumiblemente hemos encontrado un procedimiento para desensibilizar los receptores adrenérgicos del vaso aislado.

Palabras clave: Endotelio. Acetilcolina. Norepinefrina. Manguitos. Aorta de rata. Reactividad vascular.

SUMMARY

Furchgott demonstrated that acetylcholine depends on the vascular endothelium for its dilator effect when the vessel is contracted for the action of norepinephrine (NE). We have confirm this and verified that the neurotransmitter acts on the isolated vessel deprived from endothelium. This let us to believe that the incubation of the isolated vessel in acetylcholine, could potentiate the constrictive action of NE. In this study we used isolated segments of rat aorta, mechanically deprived of endothelium, immerses in Krebs-Henseleit (K-H) solution in a bath with registry tone. Single doses of NE, 10^{-6} M and increasing accumulative doses from 10^{-7} to 10^{-4} M, before and after incubation with acetylcholine; adding 1 ml of 10^{-3} M solution to the bath. As a control, another experimental series was assess with K-H solution for incubation. At the beginning and the end of the experiments, the k-H solution was replaced momentarily for a depolarizing solution (K-70) as a functional assay, because the preparation responds with a maximal contraction to this stimulus. On the contrary, the endothelium free preparation previously incubated with acetylcholine, respond with less activity to the vasoconstrictor action of NE. In this experimental situation we can hypothesize the release of a releasing factor endothelium derived. Presumably we have found a procedure for desensitization of adrenergic receptors of the isolated vessel.

Key words: Endothelium. Acetylcholine. Norepinephrine. Segments. Rat aorta. Vascular reactivity.

INTRODUCCIÓN

Furchgott (1,2) ha demostrado en diferentes preparaciones circulatorias y de vasos aislados que la acetilcolina (AcC) depende del endotelio para ejercer sus efectos vasodilatadores, al liberar de esta estructura al factor de relajación vascular

derivado del endotelio. Nosotros hemos comprobado este hallazgo en el vaso aislado, y verificado además, que en ausencia de endotelio, la AcC produce contracción definida.

Cuando el vaso tiene su endotelio intacto, es de esperar que la AcC induzca una respuesta disminuida a la norepinefrina (NE) por la liberación del factor de relajación derivado del endotelio (FRDE) en la solución que baña la preparación y que antagoniza la acción del neurotransmisor (NT) (3). En ausencia de endotelio la asociación de AcC con NE debería dar una respuesta contráctil aumentada del vaso, porque la acción vasoconstrictora de la NE se vería potenciada por la acción constrictora que tiene la acetilcolina en ausencia de endotelio.

Por otra parte, han sido publicados trabajos en los que se describen varios mecanismos por los cuales una respuesta a los efectos de los neurotransmisores puede estar disminuida. El agotamiento de la preparación por un ensayo repetido de dosis vasoconstrictoras de norepinefrina, podría estar presente. Sin embargo, esto es fácil de descartar por el empleo de vasoconstrictores que actúan por un mecanismo diferente a la norepinefrina.

Burn y Rand (4) y otros autores (5) han sostenido que la acetilcolina libera norepinefrina de las terminaciones simpáticas; esta liberación pudiera ser responsable de posibles cambios en la sensibilidad de los receptores adrenérgicos en el vaso aislado (6,7).

Esto último concuerda con nuestros resultados porque hemos obtenido una disminución del efecto vasoconstrictor de la norepinefrina en el tiempo, sin que ésta corresponda a un agotamiento de los mecanismos contráctiles de la preparación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas adultas Wistar, las cuales recibieron un golpe contundente en la región occipital, para posteriormente ser desangradas mediante la decapitación con guillotina. La aorta de las ratas fue cuidadosamente extraída a través de 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% O₂ y 5% CO₂. La solución K-H tenía la siguiente composición en mM: NaCl: 122,00; KCl: 4,87; KH₂PO₄: 1,20; MgCl₂ x 6H₂O: 120;

glucosa x H₂O: 11,15; CaCl₂ x 2H₂O: 2,00; NaHCO₃: 15,00; EDTA: 0,026.

Una vez limpiadas quirúrgicamente de tejido conjuntivo y grasa, se seleccionó una zona, menos traumatizada y se seccionó transversalmente el vaso, separando manguitos de aorta de aproximadamente 5 mm de longitud. Posteriormente, se procedió a la extracción quirúrgica del endotelio. Para lo cual se introdujo una pinza curva y fina de uso oftalmológico en el interior del manguito haciéndolo rodar y presionándolo suavemente sobre un papel de filtro humedecido con solución K-H, 3 ó 4 veces. El manguito se colocó en ganchitos con forma de estribos y se montó en un baño de órgano aislado con solución K-H, pH 7,4 y a temperatura constante de 37°C y gasificando finalmente con la misma mezcla gaseosa ya mencionada (8).

Se registraron los cambios de tono con un transductor de fuerza Grass FT 03 conectada a un fisiógrafo de la misma marca, debidamente calibrados. Después de una hora en solución K-H con una tensión basal de 1,5 g, que se ajustó a su tensión inicial cada 15 minutos y se le hizo un recambio de la solución K-H. Al inicio de todos los experimentos se cambió la solución K-H por una solución isosmótica despolarizante que contenía los componentes de la solución K-H en la cual se han reemplazado 70 mM de NaCl por un total de 70 mM de KCl. Lo mismo se repitió antes de finalizar cada experimento como forma de evaluar las condiciones contráctiles de la preparación al término de los mismos. Con esta solución despolarizante se obtuvo la contracción isométrica máxima de los manguitos, considerada ésta como 100% para efectos de medición y comparación de los efectos estudiados (9).

Se ensayaron dosis únicas de norepinefrina, 10⁻⁶ M y también crecientes y acumulativas (sin lavar), desde 0,1 ml de una solución 10⁻⁷ M hasta 0,1 ml de una 10⁻⁴ M, dejando un intervalo para cada dosis de aproximadamente 5 minutos. Durante el cual se alcanzó la contracción máxima para cada concentración de norepinefrina. Una vez observado el efecto máximo de la mayor dosis estudiada, se practicó el lavado repetido del manguito, hasta alcanzar valores iguales a los controles iniciales.

Luego se realizó la incubación de la preparación en acetilcolina, colocando durante 20 minutos, 1 ml de acetilcolina 1 x 10⁻³ M disuelta en los 15 ml de K-H que contenía el baño, al cabo de los cuales y sin

remover la acetilcolina del baño, se procedió a ensayar una segunda curva de dosis creciente y acumulativas de norepinefrina de igual valor a las estudiadas previamente.

Los registros fueron medidos milimétricamente y las respuestas al K-70 en gramos de acuerdo con la calibración practicada en cada experimento y se tomó la respuesta al K-70 como de 100% para cada experimento, para efectos del procesamiento de los datos.

A modo de control, en otra serie experimental, se usó 1 ml de solución de K-H para incubar el vaso aislado y se sometió la preparación a las mismas dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina antes y después de la incubación.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como valores promedios, con su error estándar. Se usó el test t de Student sobre datos pareados para medir el nivel de significación estadística.

RESULTADOS

Efectos de la dosis única de norepinefrina o potasio después de la incubación en acetilcolina de manguitos aislados de aorta de rata sin endotelio

Las respuestas a la norepinefrina, 10^{-6} M están disminuidas significativamente ($p < 0,02$) después

Cuadro 1

Efecto de la dosis única de norepinefrina y del potasio después de la incubación en acetilcolina en manguitos aislados de aorta de rata sin endotelio

	E (-) I K	(NE)	E (-) F (NE)	K
X ± ee	2,33 ± 0,62	92,03 ± 15,2	64,10 ± 21,3	2,27 ± 0,67
n=	10	10	10	10
p			< 0,002	> 0,05

(NE)=norepinefrina, 0,1 ml de solución 1×10^{-9} M en 15 ml.
K-70=solución despolarizante isosmótica con 70 ml de KCL.
I=ensayo antes de la incubación con acetilcolina.
F=ensayo después de la incubación con acetilcolina. K después de lavada la preparación.
NE=tono en % (K-70= 100%).
K=contracción en gramos.
ee=error estándar.

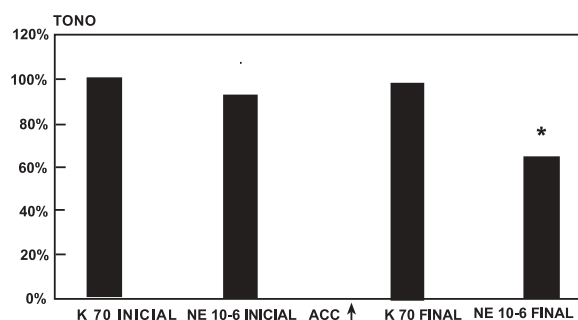


Figura 1. NE o K después de incubación del vaso aislado E (-), en AcC.
* $P < 0,05$.

de incubar la preparación en el baño al cual se agrega 1 ml de acetilcolina, 10^{-3} M. Asimismo, se observa que la incubación no modifica la respuesta contráctil a la solución despolarizante en el vaso sin endotelio (Cuadro 1, Figura 1).

Influencia de la acetilcolina sobre el efecto contráctil de la norepinefrina en dosis crecientes y acumulativas en manguitos sin endotelio aislado de aorta torácica de rata

El aumento de tensión desarrollado por efecto de la norepinefrina de los manguitos sin endotelio, después de incubarlos en acetilcolina, es significativamente menor para las concentraciones de norepinefrina 10^{-6} M ($p < 0,01$) y 10^{-5} M ($p < 0,05$) en comparación, por datos pareados, con el aumento de tensión con acetilcolina (Cuadro 2, Figura 2).

Efectos de la norepinefrina sobre el tono de los manguitos aislados de aorta de rata sin endotelio, antes y después de incubarlos en una solución control

En el Cuadro 3 y la Figura 3, se observa que no se modifican las respuestas contráctiles a la norepinefrina cuando la preparación es incubada durante 20 minutos en un solución testigo de Krebs-Henseleit (K-H).

Cuadro 2
Influencia de la acetilcolina sobre el efecto contráctil de la norepinefrina en dosis crecientes y acumulativas de manguitos sin endotelio aislados de aorta torácica de rata

Norepinefrina (NE)				
Concentración	10	9	8	7
X ± ee	75 ± 16,5	89,13 ± 13,2	106 ± 7,3	112 ± 8,3
n=	10	10	10	10
d=	15,7	13,9	16,4	6,83
s.e.d.	3,9	1,49	3,55	1,90
p'<		0,001	0,01	0,01

(AcC + NE)				
Concentración	10	9	8	7
X ± ee	71 ± 17,1	80 ± 18,9	95 ± 14,7	105 ± 10,2
n=	10	10	10	10
d=	-4,67	-9,53	-11,04	-6,98
± sed=	3,43	2,06	4,15	3,86
p''>	0,20			0,10
p''<		0,01	0,05	
p'<	0,001	0,02	0,001	0,01

(AcC)=acetilcolina, 0,1 ml de solución 1 x 10⁻³ M en 15 ml.
(NE)= primer ensayo de dosis crecientes y acumulativas de NE.
Valores en %: 100%= contracción máxima en sol. K-H/K-70 mM.

X=promedio ± error estándar.

d=promedio de las diferencias ± error estándar.

n=número de experimentos (manguitos).

p'=nivel de significación estadística según test t de Student para los datos pareados entre cada dosis de NE y su estado inmediato anterior.

p''=nivel de significación estadística según test t de Student para los datos pareados entre una misma dosis de NE antes y después de (AcC).

ee=error estándar.

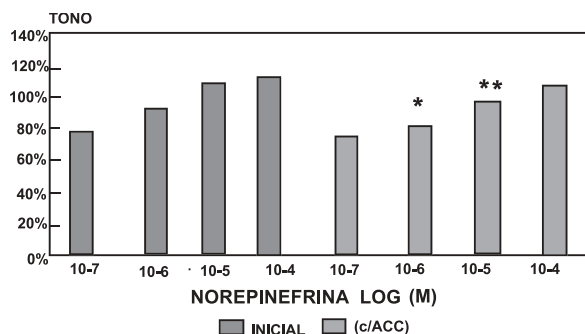


Figura 2. Norepinefrina en vasos E (-) incubados en AcC.

*P< 0,01

*P< 0,05

Cuadro 3
Efectos de la norepinefrina sobre el tono de los manguitos aislados de aorta de rata, antes y después de incubarlos en una solución control

Norepinefrina (NE)				
Concentración	10	9	8	7
X=	65 ± 8,87	98 ± 9,17	113 ± 8,93	119 ± 10,74
n=	10	10	10	10

Solución control + NE				
Concentración	10	9	8	7
X=	65 ± 9,95	90 ± 12,68	115 ± 12,49	120 ± 12,16
n=	10	10	10	10
d=	-0,10 ± 2,74	8,42 ± 2,63	1,27 ± 2,03	0,70 ± 1,23
p>	0,20		0,20	0,20
p<		0,02		

NE=primer ensayo de dosis crecientes y acumulativas de NE.
Solución control (K-H) + NE= segundo ensayo de dosis - respuesta con concentraciones crecientes y acumulativas de NE luego de incubación con solución control.

Valores en % 100%; %= máxima respuesta sobre KH/KCL 70 mM.

X=promedio ± error estándar.

d=promedio de las diferencias ± error estándar.

n=número de experimentos (manguitos).

p=nivel de significación estadística según test t Student para datos pareados.

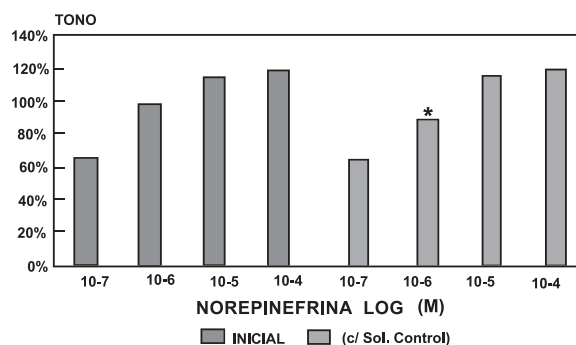


Figura 3. Norepinefrina en vasos E (-) incubados en solución control.

*P< 0,02

DISCUSIÓN

La respuesta de los manguitos de aorta sin endotelio a la norepinefrina se encuentra disminuida

en presencia de acetilcolina y una vez que la preparación ha sido incubada durante 20 minutos con este neurotransmisor.

Hemos visto que la preparación de manguitos de aorta de rata desprovistos de endotelio, es menos sensible a la norepinefrina cuando el vaso aislado ha sido incubado en acetilcolina.

Esto se observa en contraste con el hecho de que la acetilcolina produce una contracción del vaso desprovisto de su íntima (1,2). La conservación de la acción vasoconstrictora de la solución despolarizante, así como la de la norepinefrina después de incubarse en una solución control, descartan un agotamiento de los mecanismos metabólicos responsables de la contracción. Así como el ensayo de dos curvas consecutivas, la dosis efecto de norepinefrina, descarta una desensibilización por ensayo repetido de la norepinefrina en la preparación sin endotelio (10).

Sin embargo, en los experimentos controles y con la concentración de 10^{-6} M de NE, ya se observa una respuesta disminuida en los vasos sin endotelio.

Ha sido comunicado ampliamente el cambio de sensibilidad de receptores celulares específicos en forma crónica, por el empleo repetido de agonistas y, más recientemente, que es posible observar este interesante fenómeno farmacológico en forma aguda y en preparaciones de órgano aislado (6,7).

Según nuestros experimentos, no es posible observar un cambio de sensibilidad en la preparación, aun cuando se repiten dosis de norepinefrina dentro del lapso de horas. Sin embargo, y notablemente, este fenómeno se hace evidente después que la preparación ha sido incubada en acetilcolina tanto para la dosis única, como para las dosis repetidas en forma creciente y acumulativa de NE, particularmente las de 10^{-6} M y 10^{-8} M.

No es posible, hasta los momentos, hacer evidente este fenómeno en las preparaciones con endotelio, puesto que esta acción está encubierta por el efecto vasodilatador del FRDE liberado por la acetilcolina durante la incubación (3,11).

Este hallazgo nos hace pensar que podríamos haber encontrado una situación experimental, en que se ha producido una disminución de la sensibilidad de los receptores de la preparación para la

norepinefrina, en el transcurso de toda o alguna etapa de la experiencia, que es facilitada por la acetilcolina.

REFERENCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JF. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
2. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1984;24:175-197.
3. Puga C, Ferreira JM, De Sousa Y, Correa RC, Illanes A. Papel del endotelio en el efecto de la asociación de acetilcolina con vasoconstrictores sobre manguitos aislados de aorta de rata. *Mem X Jornadas Cient Tec y Educ de Guayana* 1994;38-39.
4. Burn JH, Rand MJ. The action of sympathomimetic amines in animals treated with reserpine. *J Physiol* 1958;144:394-336.
5. Guimaraes S, Paiva MQ. Two different biophases for adrenaline released by electrical stimulation or tyramine from the sympathetic nerve endings of the saphenous vein. *Arch Pharmacol* 1981;316:200-204.
6. Lefkowitz RJ, Stadel JM, Caron MG. Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: Structure and mechanisms of activation and desensitization. *Ann Rev Biochem* 1983;52:159-186.
7. Lefkowitz RJ, Caron MG, Stiles GL. Mechanisms of membrane receptor regulation. Biochemical, physiological and clinical insights derived from studies of the adrenergic receptors. *N Engl J Med* 1984;310:1570-1579.
8. 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.
9. 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.
10. Furchgott RF, Bhadrakom S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J Pharmac Exp Ther* 1953;108:129-143.
11. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.