

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA VASODILATACIÓN INDUCIDA POR LA ACETILCOLINA EN RATAS HIPERTENSAS MEDIDA *IN VIVO* O *IN VITRO*

Francisco J. Larios*
Guadalupe Bravo**
Enrique Hong**

RESUMEN

En el presente estudio se determinó el efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre la respuesta vasodepresora a la acetilcolina (Ach) en anillos de aorta y en ratas descerebradas y desmeduladas normotensas e hipertensas por medio de la coartación de la aorta. En los anillos de aorta precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M) la relajación dependiente de endotelio causada por Ach observada en los controles, se encontró significativamente deprimida en los animales hipertensos. En ambos, la relajación fue bloqueada por la N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) 10^{-4} M y revertida por L-arginina (10^{-3} M).

En contraste, no hubo diferencias en el efecto hipotensivo de Ach entre animales controles e hipertensos. Además, la administración de L-NAME (31 mg/kg) no alteró el efecto hipotensivo de la Ach. Estos resultados apoyan datos previos de que la Ach induce relajación de arterias mayores por la liberación de óxido nítrico. Sin embargo, *in vivo* la administración de L-NAME en dosis que inhiben la producción vascular de óxido nítrico no atenúa la acción vasodepresora de la Ach en animales normotensos e hipertensos, sugiriendo la presencia de otros mecanismos involucrados en la vasodilatación inducida por Ach *in vivo*.

* Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

** Departamento de Farmacología y Toxicología. Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

INTRODUCCIÓN

La acetilcolina (Ach) en preparaciones aisladas de arterias, causa relajación del músculo liso vascular por un mecanismo dependiente del

endotelio¹ atribuido a la liberación de un factor relajante derivado del endotelio (EDRF).

Posteriormente, en forma independiente, varios autores identificaron al EDRF como óxido nítrico.^{2,3,4} En las células endoteliales la síntesis del óxido nítrico convierte la L-arginina en citrulina y óxido nítrico. El óxido nítrico liberado por las células endoteliales difunde hasta el músculo liso vascular donde estimula a la guanilato ciclasa aumentando la concentración intracelular de GMPc que actúa como mediador de la relajación. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico, usando análogos de la L-arginina que actúan como falsos sustratos, ha permitido demostrar que el óxido nítrico es un potente relajante en preparaciones de anillos arteriales y en tejidos y órganos aislados.⁵ En animales íntegros, los inhibidores de la síntesis de óxido nítrico tienen un efecto presor, indicando una importante liberación basal de óxido nítrico que participa en el mantenimiento de la presión arterial.^{6,7} Sin embargo, hay evidencias de que la Ach causa la liberación endotelial de otros factores relajantes como el factor hiperpolarizante que también contribuye a su efecto vasodilatador.⁸ En estudios *in vitro* se emplea la Ach como un agente relajante para comprobar la integridad del endotelio; sin embargo, en estudios *in vivo* no está bien demostrado tal efecto ya que hay datos contradictorios en la literatura.^{7,9} El propósito de este trabajo es el de comparar la acción vasodepresora dependiente del endotelio de la Ach en preparaciones arteriales aisladas con la vasodilatación obtenida en animales íntegros, e investigar además si existen diferencias en la respuesta al inhibir la síntesis de óxido nítrico entre animales normotensos e hipertensos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los animales. Se emplearon ratas Wistar machos con peso entre 300 y 350 g. La hipertensión arterial fue inducida por el método de la coartación de la aorta. Bajo anestesia con éter a través de una incisión abdominal se expuso la aorta abdominal para hacer una ligadura parcial entre el origen de la arteria mesentérica superior y la arteria renal derecha. La reducción de la luz aórtica fue similar en todos los casos. Posteriormente se reparó la pared abdominal y

los animales fueron mantenidos en condiciones normales con alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados 17-21 días después de la coartación. En los controles se practicó el mismo procedimiento quirúrgico con la única diferencia de que no se hizo la coartación.

Estudio *in vitro*. Los experimentos fueron realizados a los 21 días postcoartación en las ratas hipertensas o de la falsa coartación en los controles. Después de sacrificar rápidamente al animal, se extrajo la aorta torácica y una vez limpia del tejido conectivo que la rodea, fue cortada en anillos de aproximadamente 3 mm de longitud. Cada anillo se colocó en una cámara para tejido aislado de 10 ml de capacidad conteniendo solución de Krebs con la siguiente composición (en mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄ 7H₂O, 1.2; CaCl₂ 2H₂O, 2.5; NaHCO₃, 25.0; glucosa, 11.7; edetato disódico y cálcico, 0.026. La solución fue mantenida a 37°C, pH 7.4 y burbujeada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Los anillos fueron montados en dos ganchos de nichrome y con hilos de seda fueron fijados al fondo de la cámara y a un transductor de tensión Grass FT03, acoplado a un polígrafo Grass para registrar los cambios de la tensión en la preparación. Los anillos fueron sometidos a una tensión inicial de 4 g y después de un periodo de estabilización de dos horas se iniciaron las curvas de relajación con Ach. Para ese propósito los anillos fueron precontraídos con fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico) a una concentración 10⁻⁶ M que produce una contracción del 80% de la respuesta máxima. Una vez alcanzada la contracción máxima se realizaron las curvas de relajación con Ach a concentraciones entre 10⁻⁹ M y 3×10⁻⁶ M. Las curvas fueron realizadas en ausencia (control) y en presencia de L-NAME (10⁻⁴ M) y de L-arginina (10⁻³ M).

Estudio *in vivo*. Los experimentos fueron realizados en la preparación de la rata descerebrada y desmedulada para evitar la influencia del sistema nervioso central. Bajo anestesia con éter, con un estilete de 3 mm de diámetro introducido por el ángulo interno de la cavidad orbitaria, se destruyó el cerebro y la médula espinal e inmediatamente el animal se conectó a una bomba de respiración artificial (60 cpm y 2 cc/kg).

Posteriormente se canuló la arteria carótida para registrar en un polígrafo *Grass* la presión arterial media con un transductor *Gould P23* y la frecuencia cardiaca con un cardiotacógrafo. La vena femoral fue canulada para la administración de fármacos en un volumen de 1 ml/kg. La curva de vasodilatación con acetilcolina (0.01 a 1.0 mg/kg) se realizó en ausencia y en presencia de L-NAME (31 mg/kg) tanto en los animales control como en los hipertensos. No se emplearon dosis mayores de Ach porque la cardiopresión contribuye a la disminución de la presión arterial. Debido a que esa dosis de L-NAME causa aumento de la presión arterial, tanto en los controles como en los animales hipertensos la presión arterial fue mantenida a un nivel de 130 mmHg con una infusión de metoxamina.

Manejo estadístico de los resultados

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media de seis a ocho observaciones obtenidas de diferentes animales. Para determinar la significancia estadística se realizó un análisis de varianza o una prueba *t* de Student para datos pareados. Una diferencia entre los grupos comparados se consideró estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Fármacos

Clorhidrato de acetilcolina, clorhidrato de fenilefrina, L-arginina y L-NAME fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co*. El clorhidrato de metoxamina de *RBI*. Los fármacos fueron preparados cada día en solución salina o en solución de Krebs.

RESULTADOS

Estudio *in vitro*. En los anillos precontraídos con fenilefrina se obtuvo una relajación casi completa con Ach en los controles, mientras que en los anillos de los animales hipertensos, a los 21 días de la coartación, la relajación máxima es de aproximadamente del 50% (Fig. 1) y hay una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas. Tanto en los controles como en los animales hipertensos la preincubación con L-NAME (10^{-4} M) bloqueó completamente la relajación a

la acetilcolina y la L-arginina (10^{-3} M) fue capaz de revertir el bloqueo causado por el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (Fig. 2).

Estudio *in vivo*. En la rata descerebrada y desmedulada no se observaron diferencias en la vasodilatación inducida por Ach en los controles o en los animales hipertensos (Fig. 3). Además, en ambos casos la administración de L-NAME a dosis de 31 mg/kg que causa una importante inhibición de la síntesis de óxido nítrico, no modificó la curva de vasodilatación a la Ach (Fig. 4).

DISCUSIÓN

Hay claras evidencias de que el factor endotelial responsable de la vasorrelajación inducida por la Ach es el óxido nítrico.^{2,3,4} Estudios subsecuentes han demostrado que las células endoteliales contienen una enzima (sintasa de óxido nítrico, NOS) que cataliza la conversión de L-arginina en óxido nítrico¹⁰ y que los inhibidores de la síntesis de óxido nítrico causan una potente reducción de la vasorrelajación a la Ach *in vitro*. Además, en diversos modelos de hipertensión arterial se ha encontrado atenuación de la respuesta relajante a la Ach y a otros agentes relajantes.¹¹ Estos datos obtenidos principalmente en preparaciones aisladas o lechos vasculares perfundidos no han sido comprobados en el animal íntegro. Los datos obtenidos en este estudio muestran una clara diferencia en la relajación inducida por la Ach. En el estudio *in vitro* la relajación se encuentra atenuada en los animales hipertensos, y en ambos es bloqueada completamente con el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, mientras que en el estudio *in vivo* no se observaron diferencias en el efecto de la Ach entre los animales normotensos y los hipertensos, y además el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico no alteró las respuestas vasodilatadoras. Es posible que en estas condiciones la vasodilatación a la Ach sea causada por la liberación de otros factores endoteliales como el factor hiperpolarizante en los vasos de resistencia o por la existencia de depósitos de óxido nítrico preformado que no es afectado por el inhibidor.¹² Se requiere de más estudios para determinar el mecanismo por el cual la Ach ocasiona el efecto vasodilatador en animales intactos.

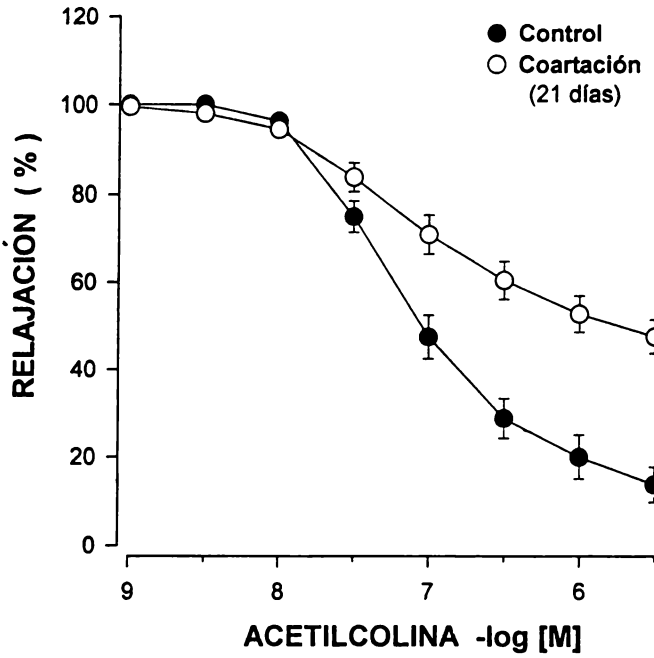


Fig. 1. Relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta de animales normotensos e hipertensos. El efecto relajante se expresa como porcentaje de la contracción causada por fenilefrina. Los símbolos representan la media \pm e.e.m. de seis experimentos.

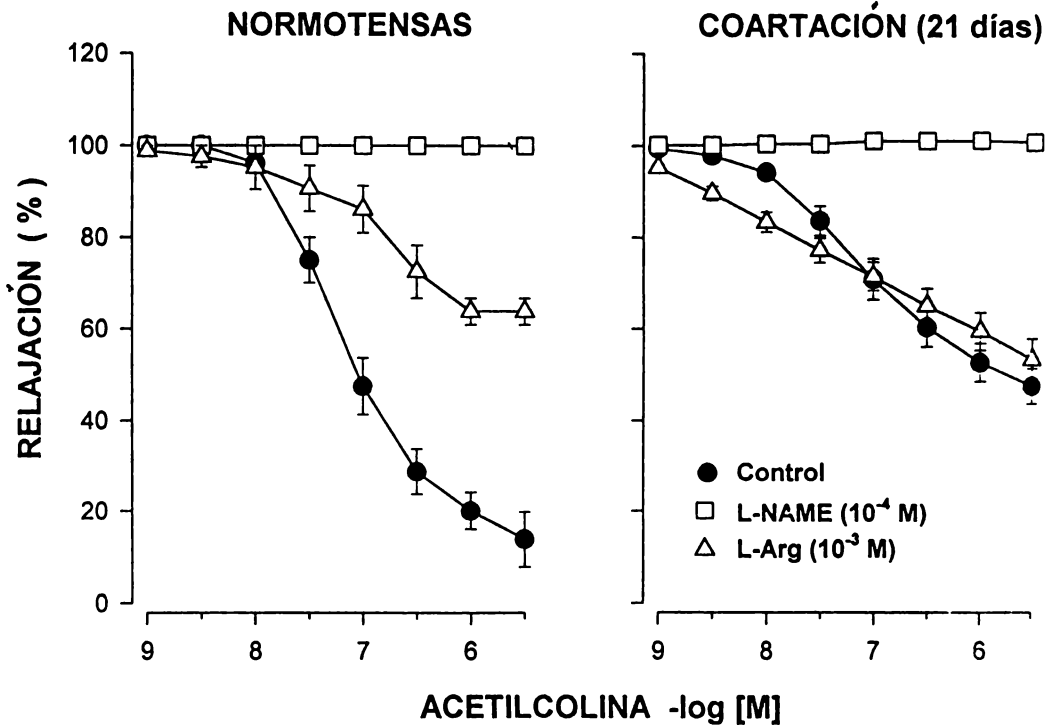


Fig. 2. Relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta de animales normotensos e hipertensos, en ausencia y en presencia de L-NAME y L-arginina. El efecto relajante se expresa como porcentaje de la contracción causada por fenilefrina. Los símbolos representan la media \pm e.e.m. de seis experimentos.

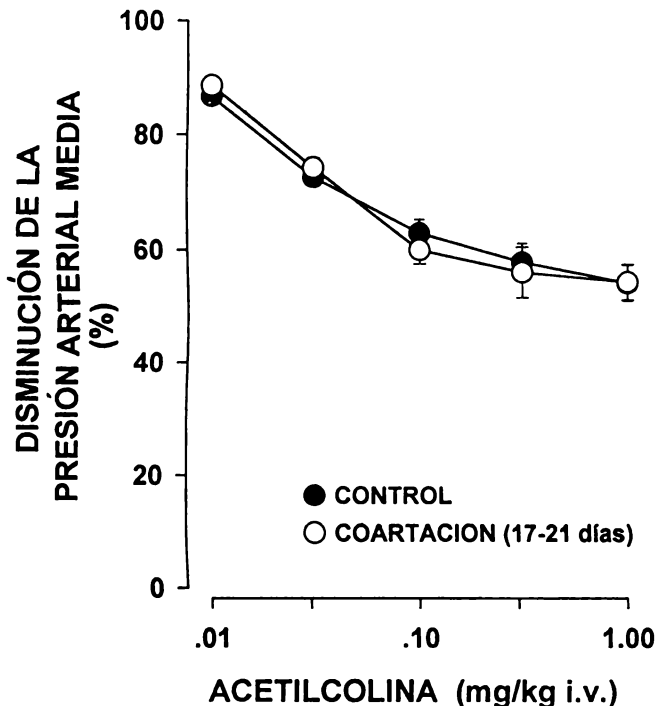


Fig. 3. Disminución de la presión arterial media causada por acetilcolina en ratas descerebradas y desmeduladas normotensas e hipertensas. La disminución de presión se expresa como porcentaje de la presión basal de 130 mmHg. Los símbolos representan la media \pm e.e.m. de ocho experimentos.

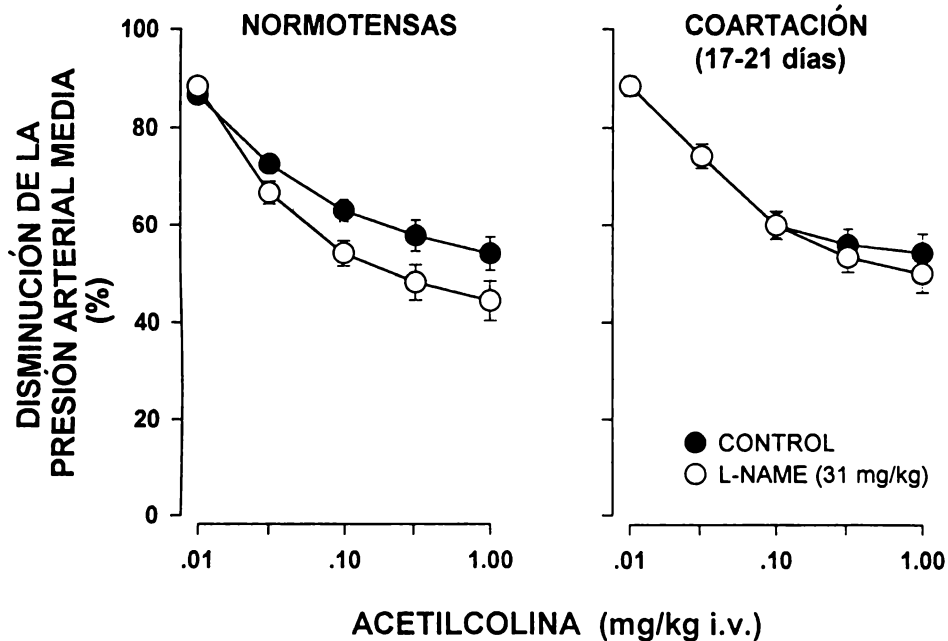


Fig. 4. Disminución de la presión arterial media causada por acetilcolina en ratas descerebradas y desmeduladas normotensas e hipertensas en ausencia y en presencia de L-NAME. La disminución de presión se expresa como porcentaje de la presión basal de 130 mmHg. Los símbolos representan la media \pm e.e.m. de ocho experimentos.

Agradecimientos

A los señores Julio Sánchez y Miguel Rosas-Lezama por el excelente apoyo técnico.

SUMMARY

In the present study the effect of L-NAME on the vasodepressor actions of acetylcholine have been determined in the pithed hypertensive rat and aortic rings from same animal. We studied the effect of Ach on isometric tension development by rings of thoracic aorta taken from sham operated and from rats with aortic coarctation-induced hypertension; the effect of Ach was studied in the absence and the presence of L-NAME. The Ach endothelium-dependent relaxation in phenylephrine (10^{-6} M) contracted aortic rings observed in sham animals were found significantly depressed in aortic rings from hypertensive animals. In both, Ach-induced relaxation were blocked by L-NAME (10^{-4} M), and reversed by L-arginine (10^{-3} M).

In contrast the Ach hypotensive effect was no different between sham and hypertensive rats and L-NAME (31 mg/kg) failed to alter the hypotensive effect of Ach in pithed rats. These data support the contention that Ach induce relaxation of larger arteries by the release of nitric oxide (NO), in which the formation of NO and the relaxation of aortic rings induced by Ach is inhibited by L-NAME. However, intravenous administration of L-NAME, in dosis that inhibit vascular NO production, increases systemic blood pressure and do not attenuates the vasodepressor actions of Ach in both, sham and hypertensive rats, suggesting a different mechanism involved in the vasodilatation induced by Ach *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Furchgott, R.F. & J.V. Zawadzki. 1980. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". *Nature*, **288**:373-376.
2. Palmer, R.M.J., A.G. Ferrige & S. Moncada. 1987. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor". *Nature*, **327**:524-526.
3. Furchgott, R.F., M.R. Khan & D. Jothianandan. 1987. "Comparison of endothelium-dependent relaxation and nitric oxide-induced relaxation in rabbit aorta". *Fed. Proc.*, **46**:385-3933.
4. Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns & G. Chaudhuri. 1987. "Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide". *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, **84**:9265-9269.
5. Amezcua, J.L., R.M.J. Palmer, B.M. De Souza & S. Moncada. 1989. "Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit". *Br. J. Pharmacol.*, **97**:1119-1124.
6. Rees, D.D., R.M.J. Palmer & S. Moncada. 1989. "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure". *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, **86**:3375-3378.
7. Whittle, B.R., J. Lopez-Belmonte & D.D. Rees. 1989. "Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelium in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation". *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 646-652.
8. Taylor, S.G. & A.H. Weston. 1988. "Endothelium-derived hyperpolarizing, a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium". *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**:272-274.
9. O'Shaughnessy, K.M., C.M. Newman & J.B. Warren. 1992. "Inhibition in the rat of nitric oxide synthesis *in vivo* does not attenuate the hypotensive action of acetylcholine, ATP or bradykinin". *Exptl. Physiol.*, **77**:285-292.
10. Bredt, D.S. & S.H. Snyder. 1990. "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme". *Proc Natl. Acad. Sci., (USA)*, **87**: 682-685.
11. Dominiczac, A.F. & Bohr D.F. 1996. "Nitric oxide and hypertension in 1995". *Curr. Op. Nephrol. Hypertens.*, **5**:174-180.
12. Davission, R.L., J.N. Bates, A.K. Johnson & S.J. Lewis. 1996. "Use-dependent loss of acetylcholine- and bradykinin- mediated vasodilation after nitric oxide synthase inhibition". *Hypertension*, **28**:354-360.