



Comparación del efecto del nitroprusiato de sodio e inhibidores de la fosfodiesterasa 5 en anillos de las arterias pulmonar principal y aorta de la rata.

Miguel Rodríguez Rondón ¹.
M Rodríguez Ziccardi ².

¹Sección de Investigaciones cardio-renales. Instituto de Medicina Experimental. Cátedra de Farmacología. Escuela Luis Razetti, UCV
rodriguez21@gmail.com

²Médico Cirujano Internal Medicine, Einstein Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. marycrz@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 26 de Mayo del 2016 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la acción de fármacos que actúan en la vía del óxido nítrico-guanilciclasa, nitroprusiato de sodio (NTPNa), sildenafile, vardenafil y tadalafilo en las arterias pulmonar y aorta de la rata con la finalidad de evaluar la selectividad vascular entre ellas y su potencia. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 350 ± 35 gramos. Luego de anestesia con tiopental sódico, se identificó la arteria pulmonar principal y la aorta. Se cortaron pequeños anillos y se colocaron con 95% O₂, 5% CO₂ en un baño para órgano aislado de 15 mL. Se determinó la disponibilidad del endotelio, estimulando con NE (1 x 10-6 M) y dilatando con acetilcolina (1 x 10-6 M). Se observaron diferencias significativas entre la arteria pulmonar principal y aorta de la rata en presencia de sildenafile y entre NTPNa y sildenafile en ambas arterias cuando se estimuló con KCl = 40 mM, sin diferencias entre arterias y vasodilatadores al estimular con NE. En las curvas de dosis respuesta a la NE, hubo un mayor efecto vasodilatador en la aorta de la rata, con un desplazamiento de la curva de 128 veces y una disminución del efecto máximo del 16,72% (p

PALABRAS CLAVE: Inhibidores de la PDE5, nitroprusiato de sodio, arteria pulmonar de rata, aorta de rata.

SUMMARY

The objective of this work was to study the action of drugs that act on the nitric oxide-guanylate cyclase, sodium nitroprusside, sildenafile, vardenafil and tadalafil in the pulmonary artery and aorta of rats in order to evaluate vascular selectivity between them and power. Sprague-Dawley rats of 350 ± 35 grams were used. After anesthesia with sodium thiopental, the main pulmonary artery and the aorta it was identified. Small rings were cut and placed with 95% O₂, 5% CO₂ in a bath for 15 mL isolated organ. Availability of endothelium was determined by stimulating with NE (1 x 10-6 M) and dilating with acetylcholine (1 x 10-6 M). Significant differences between the main pulmonary artery and aorta of the rat in the presence of sildenafile and sildenafile between NTPNa and both arteries were observed when stimulated with 40 mM KCl = no differences between arteries and by stimulating with vasodilators NE. In dose response curves to the NE, there was an increased vasodilatory effect in rat aorta with a displacement curve of 128 times and a decrease of 16.72% maximal effect (p

KEY WORDS: Inhibitors of PDE5, sodium nitroprusside, rat pulmonary artery, rat aorta.

COMPARACIÓN DEL EFECTO DEL NITROPRUSIATO DE SODIO E INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA 5 EN ANILLOS DE LAS ARTERIAS PULMONAR PRINCIPAL Y AORTA DE LA RATA.

INTRODUCCIÓN

El segundo mensajero intracelular guanosín monofosfato 3'-5' cíclico (GMPc) es uno de los principales mediadores de la señalización celular y se comporta como un mensajero interno para regular una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la relajación del músculo liso vascular ⁽¹⁾ y no vascular ⁽²⁾, natriuresis ⁽³⁾, función plaquetaria ⁽⁴⁾, adhesión de neutrófilos ⁽⁵⁾, movilidad espermática ⁽⁶⁾, secreción de líquidos y electrolitos ⁽⁷⁾ y proliferación de células

cancerígenas (8). Los niveles intracelulares de GMPc son controlados por la activación de la guanilciclase soluble y particulada (GCs y CCP) y por su degradación por la fosfodiesterasa de nucleótidos cílicos (PDEs). Los niveles citoplasmáticos de GMPc pueden ser también modulados no enzimáticamente por proteínas resistentes a múltiples drogas como las MRP 4, MRP5 y MRP 8, respectivamente que bombean GMPc o AMPc fuera de la célula (9). El efecto fisiológico del GMPc es ejercido a través de la activación de proteíncinasas dependientes de GMPc (PKG), canales iónicos activados por nucleótidos cílicos y la activación o inhibición de PDEs. La alteración en la vía dependiente de GMPc cumple un importante papel en muchas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, disfunción eréctil, síntomas del tracto urinario inferior secundario a hipertrofia prostática benigna (46, 10). En la figura 1 se muestra un esquema de la vía del GMPc

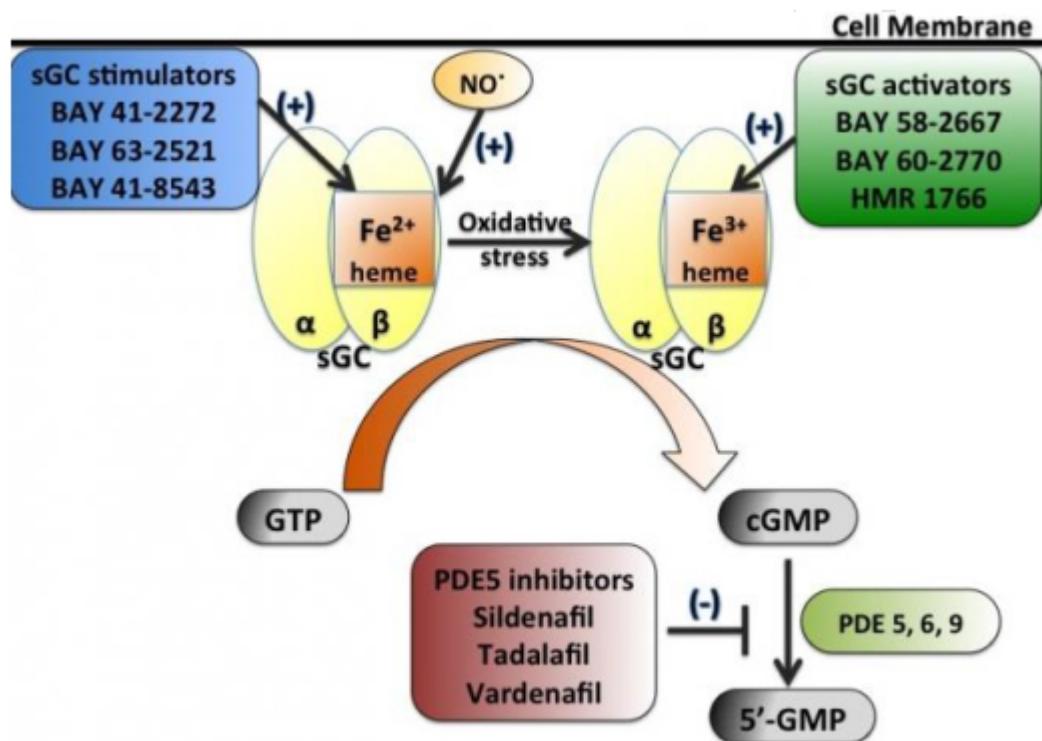


Figura 1. El óxido nítrico (NO) activa a la guanil ciclase soluble (GCs), una enzima heterodimérica compuesta por dos subunidades, alfa y beta y un grupo hemo prostético, que convierte a la guanosina trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cílico (GMPc). El NO y sus estimuladores activan a la GCs y reducen la forma Fe^{+2} mientras que los activadores actúan preferencial y efectivamente cuando la GCs está oxidada (Fe^{+3}). Los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) conducen a la acumulación de GMPc y efecto vasodilatador (Tomado de Mnica y col, 2014) (11)

El óxido nítrico derivado del endotelio (ON) es considerado el principal regulador de las funciones vasculares por su importancia en el control del tono del músculo liso vascular. En las células del músculo liso vascular la vasodilatación inducida por el NO. La integridad de la vía GMPc-GCs y NO es crítica en la regulación de la presión arterial. La concentración de calcio intracelular cumple un papel importante en la determinación del tono vascular. Numerosos

canales de calcio se han identificado en lechos vasculares sistémicos y pulmonares. Lo que sí se ha demostrado es que un incremento en sus niveles a nivel intracelular de manera permanente se relaciona con numerosas patologías como la hipertensión pulmonar (17)

Los nitratos orgánicos convencionales mimetizan la acción del NO endógeno por la estimulación de la GCs y se utilizan clínicamente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con deficiencia de NO como angina de pecho e hipertensión pulmonar (12). Para esta última patología, se han utilizado medicamentos que inhiben la fosfodiesterasa 5 (IPDE5), como el sildenafil, tadalafilo y vardenafilo, una enzima hidrolítica específica que degrada el GMPc al guanil monofosfato y que se utilizan para el tratamiento de la disfunción eréctil. Esta enzima se ha encontrado en el músculo liso vascular y estos IPDE5 amplifican la vasorelajación inducida por el NO por incrementar los niveles de GMPc (13). Unido a esto ha sido reportado que el sildenafil incrementa estos niveles sin NO exógeno en arteria coronaria de perro y mostró un efecto relajante directo en vasos aislados humanos, por lo que estas propiedades se deben a la activación del sistema NO/GMPc preexistente en estos vasos (14). Por lo menos once familias de fosfodiesterasas existen y la cafeína, fue el primer inhibidor de estas PDEs descubierto que inhibe muchas de ellas (15). Sin embargo, esta no es muy potente como inhibidor selectivo de las PDEs. Recientemente se han desarrollado compuestos que son selectivos en inhibir particulares PDEs. El sildenafil, vardenafilo y tadalafilo son los primeros compuestos de esta clase comercializados []. El vardenafilo, sildenafil y la cafeína tienen un anillo común que contiene nitrógeno y sistemas de anillos que presentan similitud con el anillo de purina del GMPc. Estos compuestos difieren en su interacción con la PDE5. El sildenafil se une al sitio catalítico de la PDE5 un millón de veces más que la cafeína, mientras que el vardenafilo es diez veces más potente que el sildenafil [15]. Se ha incrementado la evidencia que estos IPDE5 pueden ser utilizados farmacológicamente para reducir la resistencia vascular en pacientes con hipertensión pulmonar (15), encontrándose altos niveles tisulares de esta PDE5 en pulmón completo y particularmente en células del músculo liso vascular pulmonar (16)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela (Caracas), con un peso de 350 ± 35 g, mantenidos con comida (Ratarina®) y agua a voluntad. Se inyectaron intraperitonealmente con tiopental sódico (50 mg/Kg de peso) y mediante toracotomía media se extrajo ad bloc el corazón y la arteria pulmonar principal y luego se identificó y cortó pequeños anillos de la arteria pulmonar principal. Estos fueron colocados en una solución de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (en mM/litro): NaCl, 119; KCl, 4,7; MgSO₄ 1,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃ , 25; CaCl₂ , 2,5; MgSO₄ , 1,2 y glucosa, 11, burbujeada constantemente con 95% O₂ , 5% CO₂ a 37° C, pH= 7,4. Estos anillos se montaron en dos estribos de acero inoxidable y se llevaron a un baño para órgano aislado (15 mL) conectado a un transductor de fuerza-desplazamiento FTO3, (Grass Instruments C.O. Quince, Mass. USA) y este, a su vez, a un preamplificador Grass, modelo 7C, con una tensión inicial de dos gramos. Se estabilizó durante 2 horas y se indujo

una primera contracción con una solución de KCl= 40 mM para asegurar la viabilidad de la preparación. Se registró la respuesta en un polígrafo Grass, Modelo 7C a una velocidad de 2,5 mm/min. Para determinar si el endotelio estaba intacto funcionalmente, se añadió acetilcolina a una concentración de 1×10^{-6} M a la arteria pulmonar principal contraída, según el método de Furchtgott y Zawadzki (18). Los experimentos fueron expresados como la media \pm el error estándar ($X \pm EEM$). La significación estadística fue determinada por la prueba no pareada de t de Students para dos grupos de comparación. Una regresión no lineal simple se realizó en cada curva de dosis-respuesta (Graphpad Software Inc. Versión 6,01). Las curvas de dosis-respuesta al nitroprusiato de sodio se realizaron en un rango de concentraciones de 1×10^{-9} M, hasta 1×10^{-5} M y las del tadalafilo, vardenafil y sildenafile, se realizaron entre de 1×10^{-7} M, hasta 1×10^{-4} M. En otra serie de experimentos se estimuló con KCl= 40 mM; y luego de alcanzarse la contracción máxima se realizó una curva de dosis respuesta al sildenafile, (1×10^{-9} a 1×10^{-4} M) y con nitroprusiato de sodio 1×10^{-10} M, hasta 1×10^{-6} M. En otros experimentos se estimuló con norepinefrina (1×10^{-6} M), donde al alcanzarse la respuesta máxima se añadieron concentraciones crecientes de sildenafile, tadalafilo, vardenafil (1×10^{-9} a 1×10^{-6} M) y de nitroprusiato de sodio, 1×10^{-7} M, hasta 1×10^{-4} M.

Se realizaron curvas de dosis respuesta a la NE (1×10^{-10} hasta 1×10^{-5} M) en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio (1×10^{-8} M) y sildenafile (5×10^{-4} M) y de NTPNa en ausencia y en presencia de azul de metileno (MB) ($1 \cdot 10^{-5}$ M). Se administró 24 horas antes del sacrificio del animal una dosis de reserpina de 2 mg/Kg de peso, vía intraperitoneal

RESULTADOS

Efecto vasodilatador del nitroprusiato de sodio (NTPNa) al estimular con norepinefrina (NE) y por despolarización (KCl= 40 mM) en las arterias pulmonar y aorta de la rata:

Como se muestra en la tabla I, al realizar la curva de dosis respuesta al nitroprusiato de sodio se obtuvo tanto en las arteria pulmonar principal como en la aorta de la rata una vasodilatación dosis-dependiente, alcanzándose la máxima relajación a una concentración de 3×10^{-6} M para ambas arterias. En la arteria pulmonar precontraída con NE y utilizando NTPNa como vasodilatador, se obtuvo una DE50 de $1,04 \times 10^{-8}$ M y cuando se precontrajo con KCl= 40 mM se obtuvo una DE50 de $1,9 \times 10^{-8}$ M. En la aorta precontraída con NE y utilizando NTPNa como vasodilatador, se obtuvo una DE50 de 2×10^{-8} M y cuando de precontrajo con KCl= 40 mM se obtuvo una DE50 de $1,41 \times 10^{-8}$ M. Cuando se utilizó como vasodilatador el sildenafile, la arteria pulmonar precontraída con NE se obtuvo una DE50 de $3,4 \times 10^{-8}$ M y cuando de precontrajo con KCl= 40 mM se obtuvo una DE50 de 1×10^{-6} M. En la aorta precontraída con NE se obtuvo una DE50 de $2,6 \times 10^{-8}$ M y cuando de precontrajo con KCl= 40 mM se obtuvo una DE50 de 2×10^{-6} M. Aunque se observó una mayor potencia de este fármaco en la arteria pulmonar, con una diferencia de 2,47 veces, la misma no fue significativa,

siendo los valores de DE50 de $2,42 \times 10^{-8}$ M en la a. pulmonar y de $9,85 \times 10^{-9}$ M en la aorta.

Tabla I. Comparación del valor de pD_2 del nitroprusiato de sodio (NTPNa) y sildenafil sobre las arterias pulmonar y aorta de la rata precontraídas con NE y despolarización.

	Arteria pulmonar		Aorta	
	Precontraída con NE	Precontraída con KCl= 40 mM	Precontraída con NE	Precontraída con KCl= 40 mM
pD_2 Sildenafil	7,47	6 a, b	7,58	5,69 a, b
pD_2 NTPNa	7,98	7,72 b	7,7	7,85 b

pD_2 = concentración que produce el 50% del efecto máximo

a: $p<0,05$ entre arterias pulmonar y aorta contraídas con KCl= 40 mM en presencia de sildenafil

b: $p<0,05$ entre sildenafil y NTPNa utilizando KCl= 40 mM como contracturante

Curva de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio (1×10^{-8} M) en aorta de la rata:

Se realizaron curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio (1×10^{-8} M) en aorta de la rata, observándose un desplazamiento de la curva hacia la derecha en presencia del vasodilatador de 138 veces ($p<0,01$) y una disminución del efecto máximo de un 16,72%. ($p<0,05$) (Figura 2)

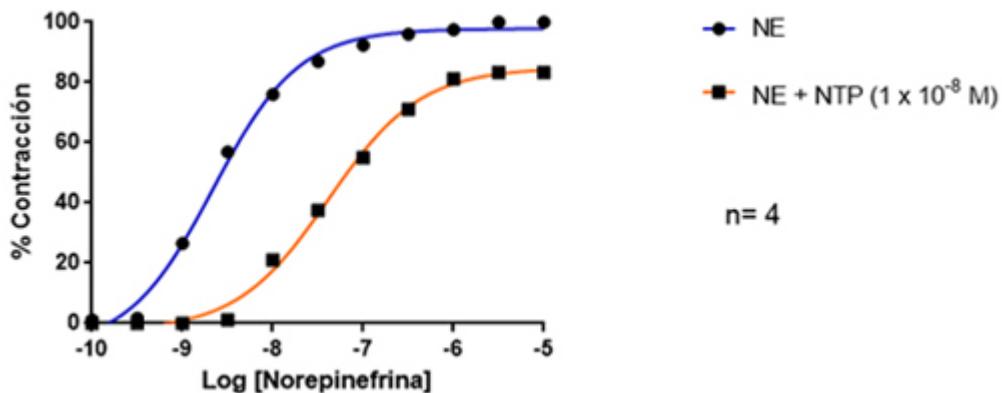


Figura 2. Curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio en anillos de aorta de la rata ($n= 4$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. La DE50 control fue de $2,2 \times 10^{-9}$ M y en presencia de nitroprusiato de sodio de 3×10^{-7} M, con una disminución del efecto máximo de un 16,72% ($p<0,05$).

Curva de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio (1×10^{-8} M) en anillos de arteria pulmonar principal de la rata:

Se realizaron curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M en ausencia y en presencia de nitroprusiato de sodio (1×10^{-8} M) en la

arteria pulmonar principal de la rata, observándose un desplazamiento hacia la derecha en presencia del vasodilatador de 7,6 veces con una disminución del efecto máximo de 10 veces. Cuando se comparan ambos lechos vasculares se observa un mayor desplazamiento en la aorta ($p < 0,05$), (Figura 3).

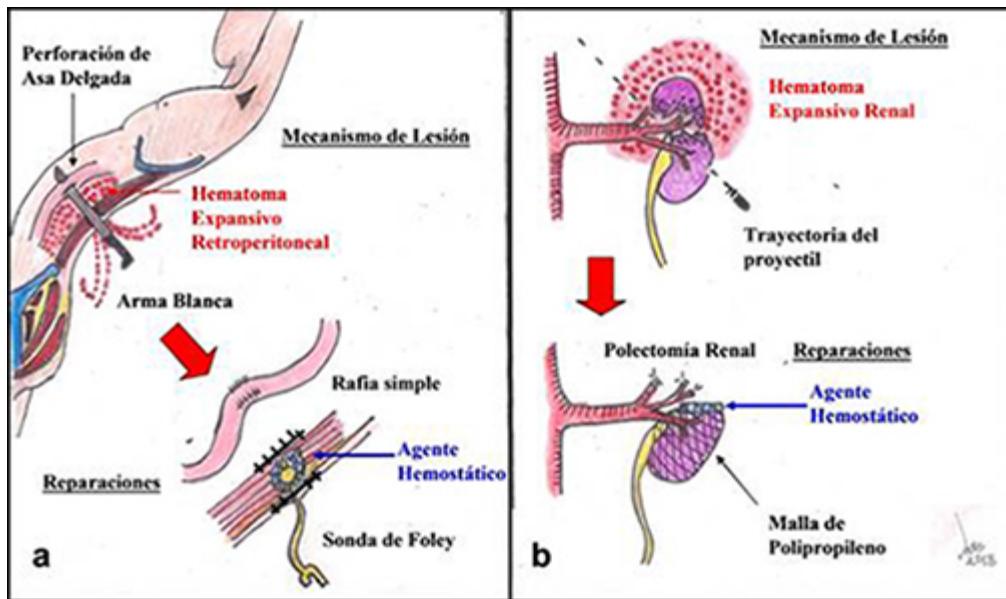


Figura 3. Curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y presencia de nitroprusíato de sodio en anillos de arteria pulmonar principal de la rata ($n= 4$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. La DE50 control fue de $3,02 \times 10^{-9}$ M y en presencia de nitroprusíato de sodio (1×10^{-8} M) de $2,3 \times 10^{-8}$ M, con una disminución del efecto máximo de un 10% ($p<0,05$).

Efecto del azul de metileno sobre anillos de arteria pulmonar principal de la rata en ausencia y en presencia de endotelio:

Se realizaron curvas de dosis-respuesta al NTPNa (1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) en ausencia y en presencia de endotelio y en ausencia y en presencia de azul de metileno (MB) 1×10^{-5} M. Se observó que el azul de metileno disminuyó la respuesta vasodilatadora del NTPNa en un 46,2% en la a. pulmonar con endotelio intacto y en un 50% en las desprovistas del mismo, no observándose diferencias significativas en cuanto al efecto vasodilatador al NTPNa en arterias desprovistas de endotelio o con endotelio intacto. (Figura 4)

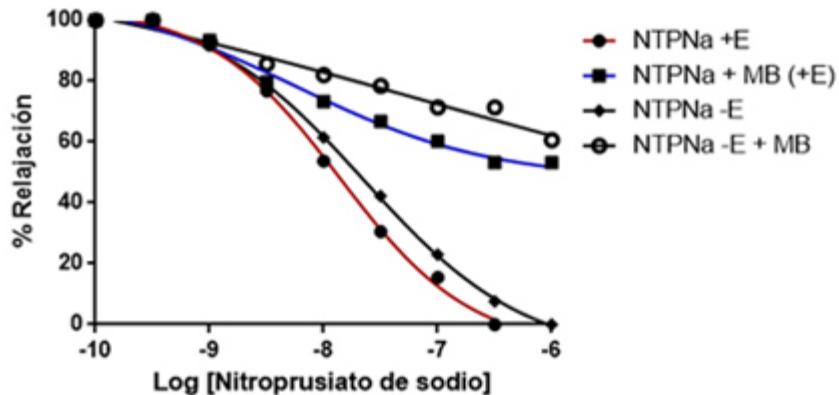


Figura 4. Curvas de dosis-respuesta al nitroprusiato de sodio (NTPNa) en ausencia y en presencia de endotelio y en ausencia y en presencia de azul de metileno (MB). Control con endotelio (●), control sin endotelio (◆). Con endotelio + MB (■), sin endotelio + MB (○). No se observaron diferencias significativas en el efecto del NTPNa con o sin endotelio, alcanzándose en ambos casos el 100% de relajación. En presencia de MB, ni en presencia ni en ausencia de endotelio, se alcanzó la relajación máxima ($p < 0,05$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. La DE_{50} control con endotelio fue de $1,38 \times 10^{-8}$ M, La DE_{50} control sin endotelio fue de $2,25 \times 10^{-8}$ M, DE_{50} control con endotelio en presencia de MB de $5,7 \times 10^{-9}$ M y sin endotelio más MB de $7,9 \times 10^{-8}$ M. $n = 5$ en todas las preparaciones.

Curva de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de sildenafil en arteria pulmonar principal de la rata:

Se realizaron curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M en ausencia y en presencia de sildenafil (1×10^{-6} M) en arteria pulmonar principal de la rata, observándose un desplazamiento hacia la derecha en presencia del vasodilatador de 5.13 veces con una disminución del efecto máximo de un 36,7%. ($p < 0,05$) (Figura 5)

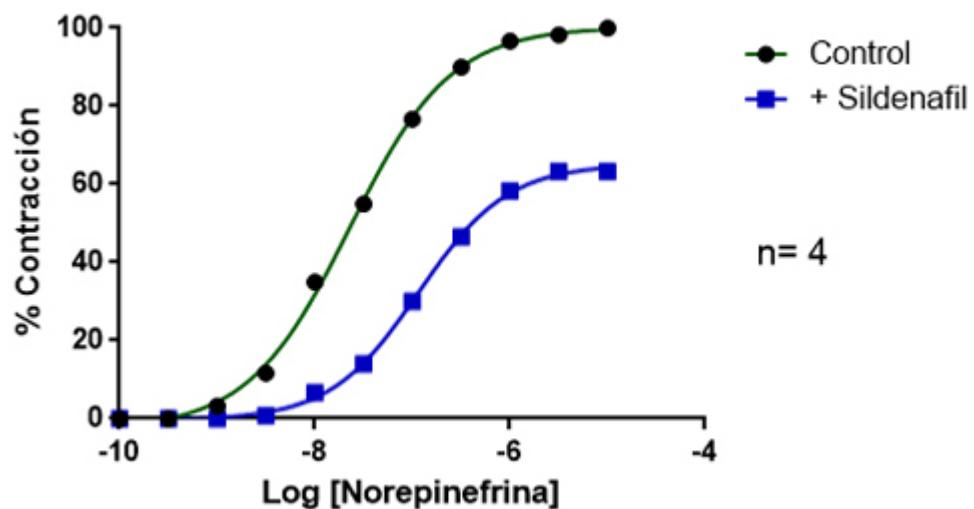


Figura 5. Curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y presencia de sildenafil (1×10^{-6} M) en anillos de arteria pulmonar principal de ratas macho ($n = 4$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. La DE_{50} control fue de $2,27 \times 10^{-8}$ M y en presencia de sildenafil de $1,16 \times 10^{-7}$ M, desplazándose 10 veces a la derecha ($p < 0,05$) con una

disminución del efecto máximo de un 40% ($p<0,05$).

Curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de sildenafil en aorta de la rata:

Se realizaron curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M en ausencia y en presencia de sildenafil (1×10^{-6} M) en aorta de la rata, observándose un desplazamiento hacia la derecha en presencia del vasodilatador de 7,1 veces con una disminución del efecto máximo del 30,29% ($p<0,05$). Cuando comparamos el efecto en ambas arterias observamos un comportamiento similar, por lo tanto decidimos realizar el próximo ensayo comparativo con tres inhibidores de la fosfodiesterasa 5; sildenafil, vardenafil y tadalafil sólo en la arteria pulmonar principal de la rata. (Figura 6)

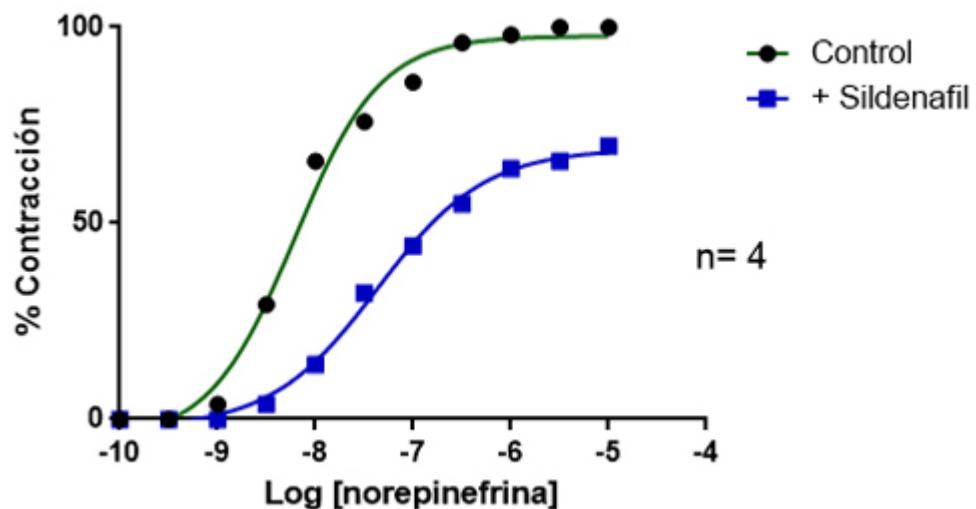


Figura 6.Curvas de dosis-respuesta a la norepinefrina en ausencia y presencia de sildenafil (1×10^{-6} M) en anillos de aorta de la rata ($n=4$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. La DE50control fue de $6,14 \times 10^{-9}$ M y en presencia de sildenafil de $4,31 \times 10^{-8}$ M, desplazándose 7,1 veces hacia la derecha ($p<0,05$) con una disminución del efecto máximo de un 30,29% ($p<0,05$).

Efecto vasodilatador de los IPDE5 en la arteria pulmonar principal de la rata:

Como se muestra en la figura 7, el vardenafil, tadalafil y sildenafil relajaron la arteria pulmonar principal de la rata de una manera dosis dependiente, siendo el vardenafil 25,4 veces más potente que el sildenafil ($p<0,05$) y 10 veces más potente que el tadalafil, mientras que el tadalafil fue más potente que el sildenafil, 2,51 veces.

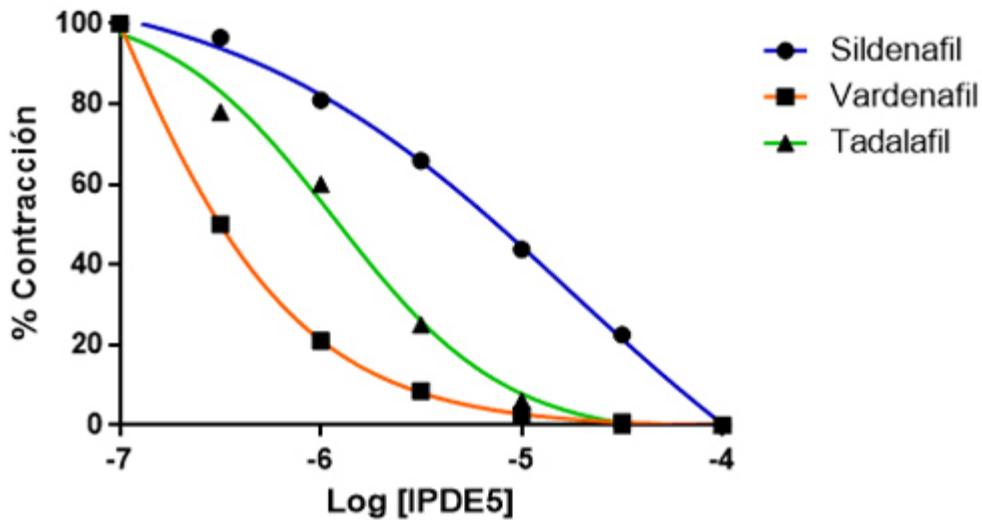


Figura 7.Curvas de dosis-respuesta al sildenafil, vardenafil y tadalafil en anillos de arteria pulmonar principal de la rata ($n= 5$). Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar. Con los tres agentes se utilizó un rango de concentración de 1×10^{-7} a 1×10^{-4} M, observándose una mayor potencia con el vardenafil($DE_{50}= 3 \cdot 10^{-7}$ M) > tadalafil ($DE_{50}= 1,18 \cdot 10^{-6}$ M) > sildenafil ($DE_{50}= 1,8 \times 10^{-5}$ M). En la arteria pulmonar principal de la rata el vardenafil es más potente que el tadalafil 3,89 veces y más que el sildenafil, 60 veces ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que todos los agentes utilizados relajan las arterias pulmonar y aorta de la rata de una manera dosis dependiente. La mayor potencia se observa con el nitroprusiato de sodio, seguido por el vardenafil, tadalafil y sildenafil, respectivamente, tanto en las arterias pulmonar como en la aorta de la rata. Este efecto es debido a un incremento en los niveles de GMPc dentro del músculo liso vascular, lo que estimularía a una proteíncinasa dependiente de GMPc y un mayor almacenamiento de calcio en los sitios intracelulares y otros sistemas efectores (19, 20, 21, 22, 23).

La entrada de calcio extracelular se debe principalmente a dos canales iónicos presentes en la membrana celular de las arterias: Canal de calcio operado por receptor (ROC) y canal de calcio voltaje dependiente (VOC). Al utilizar soluciones con alto potasio, se despolariza la célula y se presenta la entrada de calcio por los VOC. Al estimular con norepinefrina, dependiendo de la concentración utilizada se activan los VOC o los ROC, estos últimos al unirse el agonista a los receptores alfa 1 adrenérgicos presentes en la membrana de las células del músculo liso vascular. Esta activación conduce a la formación de trifosfato de inositol (IP3), que se une a un receptor de IP3 presente en la membrana del retículo sarcoplásmico, causando una contracción fásica pasajera cuando se estimula. Asimismo, la NE activa a los ROC que inducen la entrada de calcio del medio extracelular causando una contracción sostenida, tónica. Es así que cualquier agente vasodilatador a estudiar modula los niveles intracelulares de calcio para producir su efecto relajante como mecanismo final común (24)

Con respecto al nitroprusiato de sodio (NTPNa), ha sido reportado que su efecto vasodilatador es debido, por lo menos en parte a la activación de un grupo intermediario S-nitrosotiol presente en el músculo liso vascular que incrementa la síntesis de óxido nítrico, activando a una guanilciclasa de membrana, con incremento en el GMPc. La relajación mediada por el GMPc también se relaciona con una disminución en la concentración intracelular de calcio en el músculo liso vascular inducido por el NTPNa debido a la activación de muchas proteínas por fosforilación (25). En este punto, Bonaventura y col. (26) propusieron que en la arteria aorta de la rata estimulada con NTPNa, parte de la disminución en los niveles intracelulares de calcio luego de incrementar la concentración de este vasodilatador era debida a la activación de la NOS, ya que la L-NAME reducía el efecto del NTPNa. Ellos confirmaron estos resultados por el aumento de la concentración intraendotelial de calcio que incrementaría la expresión de la NOS y con esto el efecto relajante de los nitrovasodilatadores. Ellos destacaron que el aumento de calcio intraendotelial era debido a su entrada por la membrana y no a su salida por las organelas intracelulares y, a diferencia de lo observado por Moncada y col. (27) quienes demostraron en aorta de rata que la relajación inducida por el NTPNa era potenciada por el endotelio vascular debido a la activación de sintetasas constitutivas de óxido nítrico. Unido a esto se asocia este efecto con una activación metabólica en el músculo liso vascular por una proteína asociada a la membrana, con actividad generadora de óxido nítrico. Ferrer y col, reportaron en arteria femoral, mesentérica y aorta torácica de conejo una diferencia interarterial en cuanto a la sensibilidad al óxido nítrico. En experimentos preliminares no observamos diferencias significativas en cuanto a la respuesta vasodilatadora del NTPNa en ausencia de endotelio (datos no mostrados).

Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Bonaventura y col. (26) quienes en arteria aorta de rata estimulada con fenilefrina, observaron una pD2 al nitroprusiato de sodio con el endotelio intacto de 8,92, sin observarse diferencias significativas en aquellos anillos de aorta desprovistos de endotelio. Esto difiere a lo observado por Shirasaki y Su, (28) quienes demostraron en anillos de aorta de rata que el efecto vasodilatador del NTPNa y del nitrito de sodio no eran independientes del endotelio. Este observó un incremento en la acción relajante del nitroprusiato de sodio en ausencia de endotelio. Asimismo, Moncada y col. (27) observaron en anillos de aorta de rata un incremento tanto en la potencia vasoconstrictora como en la tensión desarrollada cuando se utilizaba fenilefrina como contracturante. También observaron un incremento en la potencia en ausencia de endotelio en las mismas preparaciones, cuando utilizaron una concentración de NTPNa de $1 \cdot 10^{-6}$ M, por lo que sugirieron que esto estaba relacionado con una supersensibilidad de los nitrovasodilatadores al óxido nítrico luego de la remoción del endotelio a nivel de su sitio blanco, la guanilciclasa soluble.

El efecto inhibitorio del azul de metileno (MB) sobre el efecto relajante al NTPNa en la arteria pulmonar principal de rata es debido a que el MB inhibe selectivamente la GC soluble, siendo demostrado esto por Gruetter y col, 1981 (41) quienes observaron una acumulación de GMPc luego de utilizar el MB. Así mismo produce una inactivación del NO y un efecto inhibidor directo de la óxido nítrico sintasa y otras enzimas que contienen hierro (44). Debido a que la relajación inducida por dadores de ON no está relacionada con la NO sintasa arterial,

podemos asumir que la inhibición del MB sobre el efecto vasodilatador del NTPNa es debido a la inactivación del ON o a la inhibición de la GC, que se correspondería con nuestros resultados ya que ni en ausencia ni en presencia de endotelio se alcanzó un efecto vasodilatador del 100% cuando se incubaba la arteria pulmonar con azul de metileno.

Salom y col, 1999 (42) observaron resultados diferentes a los nuestros en cuanto al modo de estimulación de la arteria carótida de conejo donde mostraron un mayor efecto relajante cuando estimulaban con agonistas que cuando estimulaban por despolarización, según nuestros resultados ni en la aorta ni en la pulmonar de la rata hubo diferencias significativas en cuanto a la respuesta vasodilatadora cuando se estimulaba con NE o por despolarización, posiblemente estos nitrovasodilatadores como consecuencia del aumento de los niveles de GMPc, permiten independientemente de la manera de preestimular la arteria, un almacenamiento del calcio en los sitios de almacenamiento intracelular. Bolotina y col, (43) reportaron resultados similares a los nuestros en aorta de conejo donde observaron que los nitrovasodilatadores una vez liberados, producen ralajación arterial no sólo por la estimulación de la GC, sino por una vía independiente relacionada con la activación directa de canales de K^+ , dependientes de Ca^{+2} (KCa).

Según nuestros resultados se observa una importante diferencia en cuanto a la respuesta del sildenafil según el modo de estimulación de la arteria pulmonar principal de la rata, vasodilatando a menores concentraciones del sildenafil cuando se estimula con norepinefrina con respecto a la estimulación por despolarización. Este efecto marcado no fue observado con el NTPNa, posiblemente el sildenafil, como prototipo de los IPDE5, module los niveles intracelulares de calcio a través de los ROC, necesitándose mayores concentraciones de sildenafil para que se influya sobre la actividad de los VOC. Cuando se estimula con agonistas, se produciría una contracción fásica inicial relacionada con la liberación del calcio almacenado intracelularmente y una contracción tónica, para mantener la respuesta contráctil (29). El hecho de observarse diferencias significativas en la respuesta al sildenafil cuando se estimula con norepinefrina puede relacionarse al hecho que este agente actúa preferentemente en la vía de señalización de calcio mediada por el trifosfato de inositol (IP3) que se encarga de activar los mecanismos de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (Karaki y col, 1988) (30, 31, 32). Güler y col, 2006 (33) encontraron resultados similares a los nuestros utilizando arteria pulmonar y aorta de conejo, donde cuando estimulaban con fenilefrina (agonista alfa adrenérgico) y realizar una curva de dosis respuesta al sildenafil (1×10^{-9} a 1×10^{-5} M) observaban un mayor efecto relajante sobre ambas arterias, que cuando estimulaban con agonistas. Otra posible explicación del efecto observado del sildenafil cuando se estimula con agonistas pudiera relacionarse con una disminución en la entrada de calcio, lo que a su vez disminuiría la liberación de calcio inducida por calcio, aunque este efecto adicional se ha observado más con el vardenafil (34). Nuestros resultados in vitro sugieren que el vardenafil podría ser más efectivo que el sildenafil y el tadalafilo para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, aunque sería importante evaluar cuál fuente de calcio está principalmente involucrada en sus mecanismos vasodilatadores (45)

En cuanto a los inhibidores de la fosfodiesterasa 5, tadalafilo, sildenafilo y vardenafilo, se observó una mayor potencia con este último, que pudiese estar relacionada con un efecto adicional

de bloqueo de los canales de calcio voltaje dependientes. Dicha actividad fue propuesta por Toque y col, (2008) ⁽³⁵⁾ y Mochida y col, 2002 ⁽³⁶⁾ quienes demostraron en arteria pulmonar aislada de conejo que el vardenafil, a diferencia del sildenafil y el tadalafilo, presentaba actividad bloqueante de los canales de calcio del plasmalema. En apoyo a esto, Corbin y col, 2004, ⁽³⁷⁾ propusieron que el vardenafil al presentar un grupo etilo en el anillo piperazina a diferencia del grupo metilo observado en el sildenafil, podría ser el responsable de las diferencias observadas. Blount y col, 2004 ⁽³⁸⁾ reportaron en una serie de ensayos la potencia y fuerza de unión de estos fármacos, donde el vardenafil además de presentar mayor potencia posee un menor rango de disociación en comparación con el tadalafilo y el sildenafil. En apoyo a nuestros resultados, Texeira y col, 2006 ⁽³⁹⁾ y Sáenz y col ⁽⁴⁰⁾ utilizando arteria aorta de rata demostraron que el vardenafil era más potente en dicha preparación, siendo relativamente equipotentes el sildenafil y el vardenafil y que dicho mecanismo estaba relacionado con un incremento intracelular en los niveles de GMPc. En conclusión, los agentes vasodilatadores utilizados producen el efecto vasodilatador por la vía del óxido nítrico, con mayor efecto al estimular por despolarización, no haciendo falta la presencia del endotelio intacto para observar la respuesta, siendo el vardenafil el más potente de los agentes utilizados, posiblemente por su efecto adicional de bloqueo de los canales de calcio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Clin Hypertens.* 2008; 10(4):304-10
2. Alexandre EC, Leiria LO, Silva FH, Mendes-Silvério CB, Calmasini FB, Davel AP, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Soluble guanylyl cyclase (sGC) degradation and impairment of nitric oxide-mediated responses in urethra from obese mice: reversal by the sGC activator BAY 60-2770. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014; 349 (1):2-9.
3. Sindić A, Hirsch JR, Velic A, Piechota H, Schlatter E. Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. *Kidney Int.* 2005; 67(4):1420-7.
4. Mendes-Silverio CB, Leiria LO, Morganti RP, Anhê GF, Marcondes S, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *PLoS One.* 2012; 7(11):e47223.
5. Jenei V, Deevi RK, Adams CA, Axelsson L, Hirst DG, Andersson T, Dib K. Nitric oxide produced in response to engagement of beta2 integrins on human neutrophils activates the monomeric GTPases Rap1 and Rap2 and promotes adhesion. *J Biol Chem.* 2006; 281(46):35008-20.
6. Willipinski-Stapelfeldt B, Lübbestedt J, Stelter S, Vogt K, Mukhopadhyay AK, Müller D. Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signalling in human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10(7):543-52.
7. Arshad N, Visweswariah SS. The multiple and enigmatic roles of guanylyl cyclase C in intestinal homeostasis. *FEBS Lett.* 2012; 586(18):2835-40.
8. Zhu H, Li JT, Zheng F, Martin E, Kots AY, Krumenacker JS, Choi BK, McCutcheon IE,

Weisbrodt N, Bögler O, Murad F, Bian K. Restoring soluble guanylyl cyclase expression and function blocks the aggressive course of glioma. *Mol Pharmacol*. 2011; 80(6):1076-84.

9. Sager G. Cyclic GMP transporters. *Neurochem Int*. 2004; 45(6):865-73.

10. Báu FR, Mónica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2010; 637(1-3):171-7.

11. Mnica FZ, Murad F, Bian K. Modulating cGMP levels as therapeutic drug targets in cardiovascular and non-cardiovascular diseases. *OA Biochemistry*. 2014; 2(1): 3.

12. Ehrlich BE, Watras J. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1988; 336:583-6.

13. Murray F, MacLean MR, and Pyne NJ. Increased expression on the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002; 137: 1187-1194.

14. Wallis, R.M., Corbin, J.D., Francis, S.H., Ellis, P., Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am. J. Cardiol*. 1999; 83, 3C-12C

15. Zhao, L., Mason, N.A., Morrell, N.W., Kojonazarov, B., Sadykov, A., Maripov, A., Mirrakhimov, M.M., Aldashev, A., Wilkins, M.R., Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001; 104, 424-428.

16. Pauvert, O., Salvail, D., Rousseau, E., Lugnier, C., Marthan, R., Savineau, J.P., Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. *Biochem. Pharmacol*. 2002; 63, 1763-1772.

17. Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K.J., Sato, K., Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev*. 1997; 49, 157- 230.

18. Furchtgott, R. and Zawadzki, J.. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376

19. Schwartz, G. and R. Kloner, A. "Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Circulation*. 2010; 122 (1): 88-95.

20. Murray F, MacLean MR, and Pyne NJ. Increased expression on the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002; 137: 1187-1194.

21. Saenz de Tejada, I., Angulo, J., Cuevas, P., Fernández, A., Moncada, I., Allona, A., Lledo, E., Korschen, H.G., Niewohner, U., Haning, H., et al., The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int. J. Impot. Res*. 2001; 13, 282-290.

22. Casteels, R; Kitamura, K, Kitamura, H. and Suzuki, H.. The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol*. 271: 41-61

23. Guler, N; Ozbek, H. and Eryonucu, B. 2006. Vasorelaxant effect of sildenafil on aorta and pulmonary artery in rabbits. *Int. J. Pharmacol*. 1977; 2(1): 55-59

24. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone: A potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol*.

25. S. Abe, H. Kanaide, M. Nakamura, Front-surface fluorometry with fura-2 and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101: 545-552.
26. Bonaventura, D; Lunardi, C; Rodrigues, G; Neto, M and Bendhack, L. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide.* 2008; 18: 287-295
27. Moncada, S., Rees, D; R. Schulz, R.M. Palmer, Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 2166-2170
28. Shirasaki, Y. and Su, C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur. J. Pharmacol.* 1985; 114: 93-96.
29. Khalil 2010. Regulation of Vascular Smooth Muscle Function Raouf A. Khalil 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. [En línea] <http://www.fishpond.com.au/Books/Regulation-of-Vascular-Smooth-Muscle-Function-Colloquium-Series-on-Integrated-Systems-Physiology-Raouf-Khalil-D-Neil-Granger-Series-edited-by/9781615041800> [Consulta: 30 de Agosto de 2015]
30. Karaki, H; Sato, K. and Ozaki, H.. Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca^{+2} tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 151: 325-328.
31. Guilbert, C; Marthan, R and Savineau, J. Angiotensin I-induced Ca^{+2} oscillations in vascular myocytes from rat pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: L637-642
32. Khalil 2010. Regulation of Vascular Smooth Muscle Function Raouf A. Khalil 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. [En línea] <http://www.fishpond.com.au/Books/Regulation-of-Vascular-Smooth-Muscle-Function-Colloquium-Series-on-Integrated-Systems-Physiology-Raouf-Khalil-D-Neil-Granger-Series-edited-by/9781615041800> [Consulta: 30 de Agosto de 2015]
33. Guler, N; Ozbek, H. and Eryonucu, B.. Vasorelaxant effect of sildenafil on aorta and pulmonary artery in rabbits. *Int. J. Pharmacol.* 2006; 2(1): 55-59
34. Toque, H; Teixeira, C; Priviero, F; Morganti, B; Antunes, E and De Nucci, G. Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium-channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154: 787-796
35. Toque, H; Teixeira, C; Priviero, F; Morganti, B; Antunes, E and De Nucci, G.. Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium-channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154: 787-796
36. Mochida H, Inoue H, Takagi M, Noto T, Yano K, and Kikkawa K. Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2002; 440:45-52.
37. Corbin, J; Beasley, A; Blount, M. and Sharon, F.. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem. Int.* 2004; 45: 859-863
38. Blount MA, Beasley A, Zoragh R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH, Corbin JD. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(1):144-52.

39. Teixeira, C; Priviero, F. and R. Webb, C.. Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 316:654-661
40. Saenz de Tejada, I., Angulo, J., Cuevas, P., Fernández, A., Moncada, I., Allona, A., Lledo, E., Korschen, H.G., Niewohner, U., Haning, H., et al... The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int. J. Impot. Res.* 2001; 13, 282-290.
41. Gruetter C. A., Gruetter D. Y., Lyon J. E., Kadowitz P. J. and Ignarro L. J.. Relationship between cyclic guanosine monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceril trinitrates, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981; 219: 181-186.
42. Salom, J.; Barbera, M; Centeno, J; Ortí, M; Torregrosa, G. and Alborch, E. Comparative Relaxant Effects of the NO Donors Sodium Nitroprusside, DEA/NO and SPER/NO in Rabbit Carotid Arteries. *Gen. Pharmac.* 1999; 32(1): 75-79.
43. Bolotina V. M., Najibi S., Palacino J. J., Pagano P. J. and Cohen R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 2008; 368, 850-853
44. Mayer B., Brunner F. and Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45: 367-374.
45. Schwartz, G. and R. Kloner, A. "Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Circulation.* 2010; 122 (1): 88-95.
46. Paracha, T; Pobsuk, N; Salaloy, N y col. Elucidation of Vasodilation Response and Structure Activity Relationships of N2,N4-Disubstituted Quinazoline 2,4-Diamines in a Rat Pulmonary. *Molecules.* 2019, 24, 281: 2-16