



Comparación del efecto vasodilatador del verapamil y la hidralazina en anillos de las arterias pulmonar principal y aorta de la rata estimulados con norepinefrina y por despolarización

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

Consignado el 06 de Enero del 2020 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar las diferencias en la respuesta a la

hidralazina y el verapamil entre la aorta y la arteria pulmonar principal de la rata. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 340 ± 28 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 añadiendo acetilcolina (1 x 10⁻⁶ M). En la curva de dosis respuesta al verapamil (1 x 10⁻⁷ hasta 1 x 10⁻⁴ M) se produjo una vasodilatación dosis dependiente cuando se contrajo con NE (1 x 10⁻⁷ M), disminuyéndose el efecto máximo en la aorta en un 58,55% ($p < 0,05$), sin cambios significativos en el efecto relajante entre ambas arterias. Cuando se estimuló con KCl= 40 mM presentaron ambas arterias un comportamiento similar. En la aorta, el verapamil desplazó la curva de dosis respuesta a la NE hacia la derecha, 4,57 veces sin cambios en el efecto máximo y en la arteria pulmonar, la desplazó 3,55 veces, con una disminución significativa de la respuesta máxima de un 13,28% ($p < 0,05$). En una solución libre de calcio y alta en K⁺, la adición acumulativa de CaCl₂ (1 x 10⁻⁵ M, hasta 1 x 10⁻³ M), produjo en ambas arterias un incremento en la respuesta contráctil dosis dependiente. El pretratamiento de la aorta y pulmonar con verapamil eliminó casi completamente la contracción. Cuando se estimuló con NE, la máxima relajación inducida por 1 x 10⁻³ M de hidralazina en ambas arterias fue similar (79,9% pulmonar vs 82,85 en la aorta). Al estimular con KCl= 40 mM, se obtuvo una mayor relajación en la aorta que en la pulmonar (99,32% vs 93%), sin diferencias en la acción de la hidralazina entre ambas arterias. Cuando se estimuló con CaCl₂ se desplazó la curva hacia la derecha en ambas arterias ($p < 0,05$), con disminución significativa del efecto máximo de un 16,94% en la aorta ($p < 0,05$) y de un 26,72% en la pulmonar. En conclusión, la aorta dependería más para su contracción de los mecanismos de liberación de calcio del RS, mientras la arteria pulmonar dependería más de los mecanismos de entrada del mismo por el sarcolema, pudiendo afectar la hidralazina preferencialmente a los ROC en la arteria pulmonar, que modularían más la respuesta contráctil en esta arteria, siendo su efecto mayor en el músculo liso vascular que en el endotelio.

PALABRAS CLAVE: arteria pulmonar, verapamil, aorta

COMPARISON OF EFFECTS OF VERAPAMIL AND HYDRALAZINE IN RING OF PULMONARY ARTERY AND AORTA OF RAT STIMULATED FOR NOREPHINEFRINE AND DESPOLARIZATION

SUMMARY

This study was conducted in order to evaluate differences in the response to verapamil and hydralazine between the aorta and the main pulmonary artery of the rat. Sprague-Dawley rats of 340 ± 28 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 adding acetylcholine (1 x 10⁻⁶ M). In the dose response curve verapamil (1 x 10⁻⁷ to 1 x 10⁻⁴ M) produced a dose-dependent vasodilation when it contracted with NE (1 X 10⁻⁷ M), decrease the maximum effect in the aorta one 58,55% (p

KEY WORDS: pulmonary artery, verapamil, aorta

COMPARACIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DEL VERAPAMIL Y LA HIDRALAZINA EN ANILLOS DE LAS ARTERIAS PULMONAR PRINCIPAL Y AORTA DE LA RATA ESTIMULADOS CON NOREPINEFRINA Y POR DESPOLARIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

La contracción del músculo liso vascular (mlv) es un proceso complejo que se inicia cuando neurotransmisores vasoconstrictores u hormonas activan receptores en la superficie celular. Muchos de estos activan diferentes proteínas G que están acoplados a diferentes canales iónicos y enzimas, regulando sus actividades. Entre estas enzimas se encuentra la fosfolipasa C (PLC) que metaboliza el inositol 4,5 bifosfato y produce inositol 1,4,5 trifosfato y 1,2 diacilglicerol (DG). La adenilciclasa (AC) que metaboliza al ATP para producir AMPc(1)(2) . Además, la activación del metabolismo del fosfatidilinositol, sustancias vasoconstrictoras como la norepinefrina y la 5-hidroxitriptamina, dependiendo de la concentración, despolarizan el músculo liso vascular y activan canales de calcio operados por voltaje (VOC) en la membrana plasmática del músculo liso vascular, conduciendo a una entrada de calcio. La activación de los mecanismos descritos incrementan la $[Ca^{+2}]_i$, que constituye la vía de señalización más importante en producir vasoconstricción (3).

Luego de incrementarse la $[Ca^{+2}]_i$, el calcio se une a la calmodulina y forma un complejo calcio calmodulina, que remueve la autoinhibición de la miosín cinasa de cadena ligera (1) . La miosín cinasa de cadena ligera activada, fosforila reversiblemente a la cadena ligera de la miosina y activa a la miosín ATPasa (4) . La miosina fosforilada cíclicamente se une a los filamentos de actina para producir acortamiento del mlv o incremento de la fuerza contráctil (5) . Cuando la $[Ca^{+2}]_i$ disminuye, se inactiva la miosín cinasa de cadena ligera, lo que conduce a la defosforilación de la miosina por la miosín fosfatasa causando relajación del mlv (6) . Sin embargo, la fuerza contráctil no depende directamente de la $[Ca^{+2}]_i$, si no que la fuerza puede ser incrementada aumentando la respuesta de la maquinaria contráctil al calcio, o la sensibilidad de los miofilamentos a la $[Ca^{+2}]_i$, (7) . Cambios en la concentración de calmodulina, producidos por pequeñas proteínas G que fosforilan a la miosín cinasa de cadena ligera (ej. Rho A) y sus enzimas asociadas (cinasas asociadas con las Rho), así como la regulación de la actividad de la miosín fosfatasa y las proteínas asociadas con los filamentos delgados, como la calponina y el caldesmón, explicarían los posibles mecanismos involucrados en la regulación de la sensibilidad del calcio intracelular. Estos mecanismos que cambian la sensibilidad al calcio junto con los principales mecanismos reguladores del metabolismo celular del mismo cumplen un papel importante en la regulación del tono del mlv (8) y estas alteraciones en el movimiento intracelular de calcio está relacionado con la hipertensión pulmonar (27). En la figura 1 se muestra un esquema de los mecanismos propuestos asociados con el incremento en la concentración de calcio intracelular, la vasoconstricción y el remodelaje vascular pulmonar.

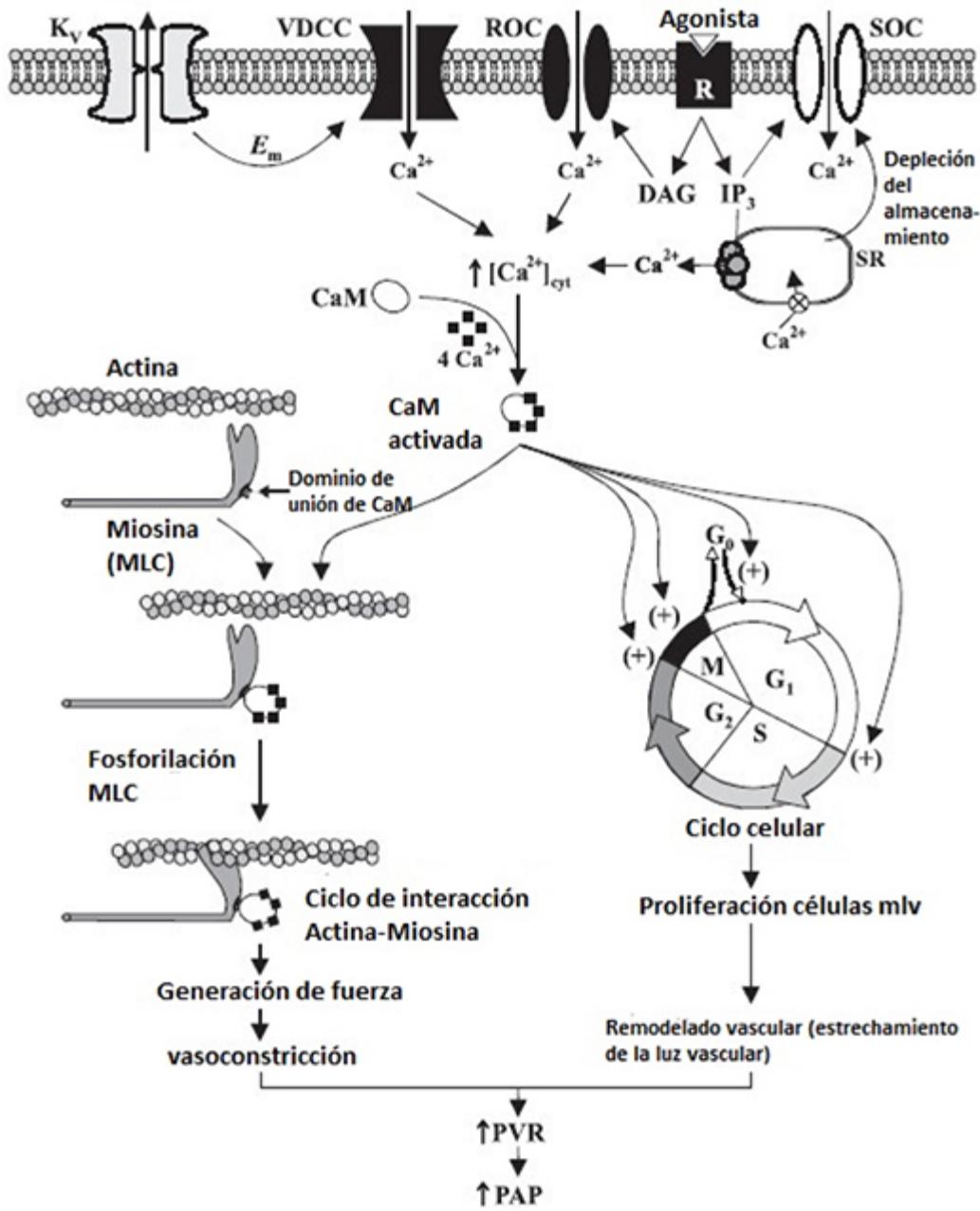


Figura 1. Mecanismos propuestos que explican por qué cuando se incrementa la concentración intracelular de calcio se dispara la vasoconstricción pulmonar y se promueve el remodelaje vascular pulmonar. Una disminución en la actividad de los canales de K⁺ voltaje dependientes (KV) despolariza la membrana lo que conduce a un incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺, por inducirse la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC). Además, la activación de los receptores de membrana (R), como los acoplados a la proteína G y los que presentan actividad de tirocín cinasa, conducen a la producción de diacilglicerol (DG) y 1,4,5,-trifosfato de inositol (IP₃) incrementándose los niveles intracelulares de Ca²⁺ por abrirse los canales de calcio operados por receptor (ROC) e inducir la movilización del Ca²⁺ desde el retículo sarcoplásmico (RS). El IP₃ también induce la apertura de canales de Ca²⁺ operados por almacenamiento (SOC) directa o indirectamente por la disminución del almacenamiento para posteriormente incrementarse la unión Ca²⁺ -calmodulina. Este complejo se une y activa a la miosín cinasa de cadena ligera (MLCK). Esto conduce a una

fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) que estimula a su vez la actividad de la miosín ATPasa, hidrolizando el ATP para generar energía para el ciclo de unión de la actina con la miosina. La formación de estos puentes cruzados entre la actina y la miosina comienza la contracción celular del músculo lisovascular. Además, los niveles elevados de calcio intracelular son responsables de permitir la proliferación celular por activación de la mitosis. El complejo Ca⁺²-calmodulina activa por lo menos cuatro pasos en el ciclo celular (indicados con "+"). La vasoconstricción y la remodelación vascular (ej. Hipertrofia de la media debido a la proliferación del mlv) conduce a una elevación crónica y sostenida de la resistencia vascular pulmonar (PVR) y de la presión arterial pulmonar (PAP). Tomado de Mandegar y col. 2004⁽²⁴⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas mantenidas 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 y por incisión media torácica se identificó la aorta y se cortaron anillos de 5 mm de longitud. Estos fueron colocados en una solución de KrebsHenseleit 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 fuerzadesplazamiento 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 Gras, 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 x 10⁻⁶ M a la arteria pulmonar principal contraída, según el método de Furchgott y Zawadzki (9) . Los experimentos fueron expresados como la media ± el error estándar (X±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 verapamil se realizaron en un rango de concentraciones de 1 x 10⁻⁷ M, hasta 1 x 10⁻⁴ M y las de la hidralazina se realizaron entre 1 x 10⁻⁵ M, hasta 1 x 10⁻³ M, estimulando con NE (1 x 10⁻⁷ M) y por despolarización (KCl= 40 mM). En otra serie de experimentos se realizaron curvas de dosis respuesta a la NE (1 x 10⁻¹⁰ a 1 x 10⁻⁵ M) en ausencia y en presencia de verapamil (1 x 10⁻⁶ M) e hidralazina (5 x 10⁻⁴ M). En otra serie de experimentos se estimuló con concentraciones crecientes de CaCl₂ (1 x 10⁻⁵ a 1 x 10⁻³ M) en ausencia y en presencia de verapamil e hidralazina.

RESULTADOS

Curvas de dosis respuesta al verapamil estimuladas por norepinefrina en las arterias

pulmonar principal y aorta de la rata.

Al añadir dosis crecientes de verapamil (1×10^{-7} hasta 1×10^{-4} M) se produjo una vasodilatación dependiente de la dosis de la contracción inducida por NE (1×10^{-7} M) en las arterias pulmonar principal y aorta de la rata. En la arteria pulmonar, la máxima relajación inducida por 3×10^{-4} M de verapamil fue del 100% y la CI₅₀ de 6.9×10^{-6} M. En la aorta, se disminuyó la relajación inducida por 1×10^{-6} M de verapamil en un 58,55% y la CI₅₀ fue de 6.4×10^{-6} M, siendo este valor 0,62 veces menor en la pulmonar ($p < 0.05$) ($n = 7$) (figura 2).

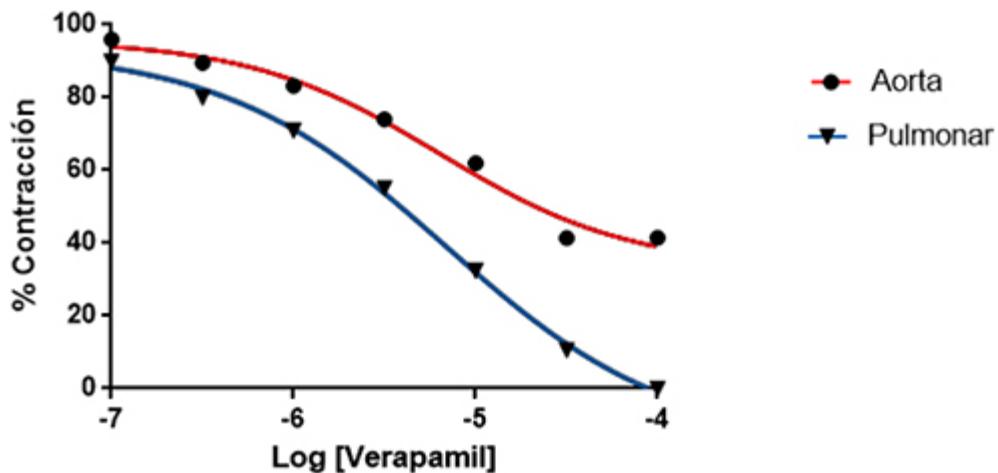


Figura 2. Curvas de dosis respuesta al verapamil en las arterias pulmonar y aorta de la rata utilizando norepinefrina (1×10^{-7} M) como contracturante. Cuando se alcanzó el efecto máximo, se añadieron dosis crecientes de verapamil (1×10^{-7} a 1×10^{-4} M) hasta obtener el efecto relajante máximo. En la arteria pulmonar, la máxima relajación producida por 1×10^{-4} M de verapamil fue del 100% y la CI₅₀ de 6.9×10^{-6} M ($n = 7$). En la aorta, la máxima relajación producida por 1×10^{-4} M de verapamil fue del 58,55% y la CI₅₀ de 6.4×10^{-6} M ($n = 7$).

Curvas de dosis respuesta al verapamil estimulada por KCl= 40 mM en las arterias pulmonar principal y aorta de la rata.

Como se observa en la figura 3, cuando se estimuló con KCl= 40 mM, el verapamil produjo una relajación dependiente de la dosis en ambas arterias. En la arteria pulmonar la máxima relajación (100%) se obtuvo con una concentración de 1×10^{-4} M de verapamil y la CI₅₀ fue de 7.24×10^{-7} M ($n = 8$). En la aorta, se obtuvo la relajación máxima (100%) a una concentración de 1×10^{-4} M de verapamil, con una CI₅₀ de 9.55×10^{-7} M ($n = 6$), no encontrándose diferencias significativas entre ambos valores.

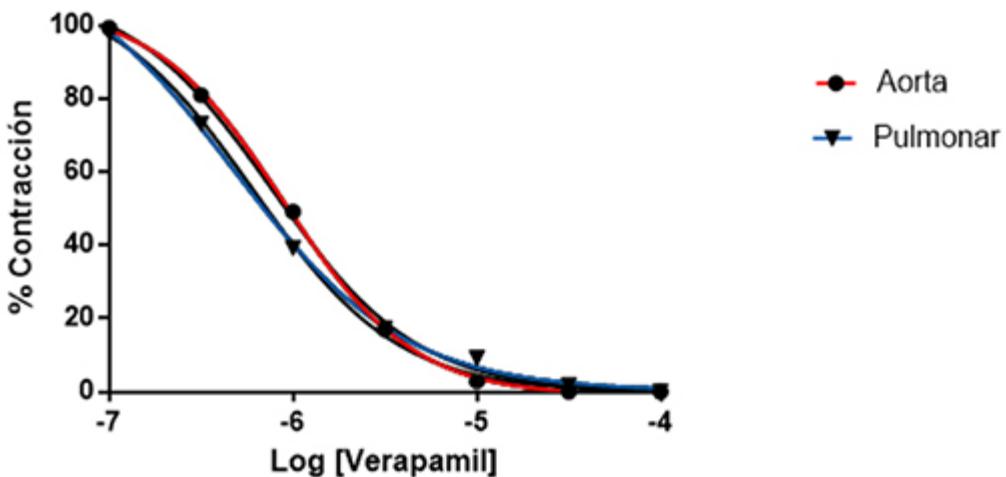


Figura 3. Curvas de dosis respuesta al verapamil en las arterias pulmonar y aorta de la rata utilizando solución depolarizante ($KCl= 40\text{ mM}$). Cuando se alcanzó el efecto máximo, se añadieron dosis crecientes de verapamil ($1 \times 10^{-7} \text{ a } 1 \times 10^{-4}\text{ M}$) hasta obtener el efecto relajante máximo. En la arteria pulmonar la máxima relajación (100%) se obtuvo con una concentración de $1 \times 10^{-4}\text{ M}$ de verapamil y la CI_{50} fue de $7,24 \times 10^{-7}\text{ M}$ ($n= 8$). En la aorta, se obtuvo la relajación máxima (100%) a una concentración de $1 \times 10^{-4}\text{ M}$ de verapamil, con una CI_{50} de $9,55 \times 10^{-7}\text{ M}$ ($n= 6$), no encontrándose diferencias significativas entre ambos valores.

Efecto del pretratamiento con verapamil sobre la respuesta contráctil inducida por concentraciones crecientes de NE:

En la figura 4 se muestra la respuesta contráctil de las arterias pulmonar y aorta de la rata (figura 5) a concentraciones crecientes de NE ($1 \times 10^{-10} \text{ a } 1 \times 10^{-5}\text{ M}$) en ausencia y presencia de verapamil ($1 \times 10^{-6}\text{ M}$) como porcentaje de la respuesta máxima obtenida con 40 mM de KCl . En la aorta, la DE_{50} control fue de $3,5 \times 10^{-9}\text{ M}$ y en presencia de verapamil de $2,45 \times 10^{-8}\text{ M}$ ($n= 5$), desplazándose hacia la derecha 4,57 veces ($p<0,05$). En la arteria pulmonar, en presencia de verapamil se desplazó la curva de dosis respuesta hacia la derecha en 3,55 veces, ($p<0,05$) con una DE_{50} control de $7 \times 10^{-9}\text{ M}$ y en presencia de verapamil de $2,45 \times 10^{-8}\text{ M}$, con una disminución significativa de la respuesta máxima de un 13,3% ($p< 0,01$).

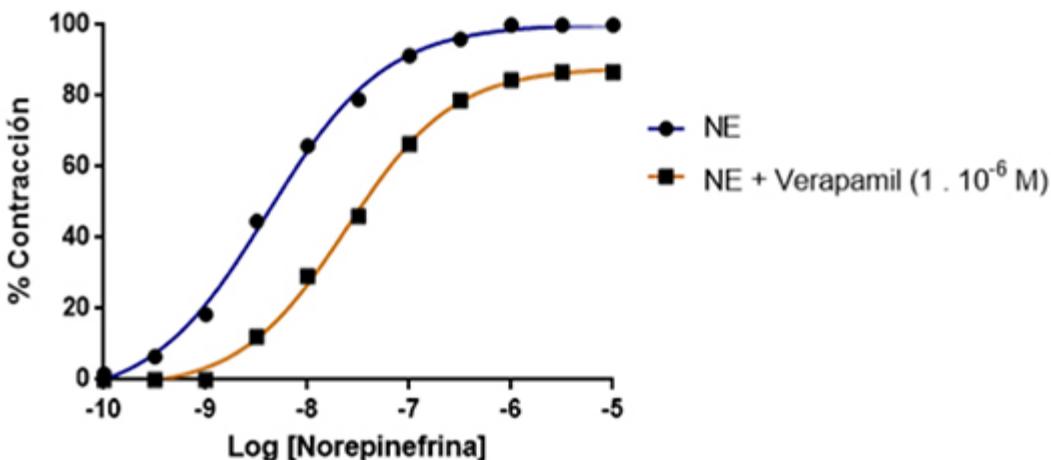


Figura 4. Curva de dosis respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de verapamil (1×10^{-7} M) en anillos de arteria pulmonar de rata. El verapamil produjo un desplazamiento de la curva de dosis respuesta a la NE de 3,55 veces ($p<0,05$) con una DE50 control de 4×10^{-9} M y en presencia de verapamil de $2,4 \times 10^{-8}$ M, con una disminución significativa de la respuesta máxima de un 13,3% ($p<0,05$).

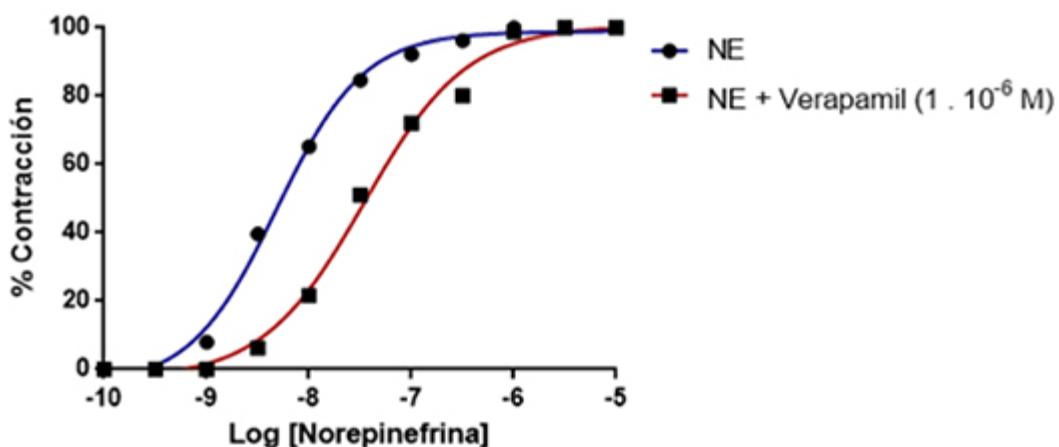


Figura 5. Curva de dosis respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de verapamil (1×10^{-7} M) en anillos de aorta de rata. El verapamil produjo un desplazamiento de la curva de dosis respuesta a la NE de 7,24 veces ($p<0,05$) con una DE50 control de $4,8 \times 10^{-9}$ M y en presencia de verapamil de $3,5 \times 10^{-8}$ M ($n=5$), sin diferencias significativas en el efecto máximo.

Efecto del verapamil sobre la contracción obtenida por concentraciones crecientes de calcio en preparaciones despolarizadas:

En una solución de Krebs-Henseleit libre de calcio y alta en K+, la adición acumulativa de CaCl₂ (1×10^{-5} M, hasta 1×10^{-3} M), produjo en las arterias pulmonar y aorta de la rata un incremento en la respuesta contráctil dosis dependiente. El pretratamiento de la aorta con verapamil (1×10^{-6} M) durante 30 minutos eliminó casi completamente la contracción ($n=5$).

En la arteria pulmonar, el pretratamiento con verapamil produjo un efecto similar al encontrado en la aorta ($n= 5$) (datos no mostrados).

Curvas de dosis respuesta a la hidralazina estimuladas por norepinefrina en las arterias pulmonar principal y aorta de la rata.

Al añadir dosis crecientes de hidralazina (1×10^{-5} - 1×10^{-3} M) se produjo una vasodilatación dependiente de la dosis de la contracción inducida por NE (1×10^{-7} M) en las arterias pulmonar principal y aorta de la rata. En la arteria pulmonar, la máxima relajación inducida por 1×10^{-3} M de hidralazina fue del 79,9% y la CI₅₀ de $3,2 \times 10^{-4}$ M. En la aorta, la máxima relajación producida a la misma concentración fue del 82,85% y la CI₅₀ de $5,24 \times 10^{-4}$ M, encontrándose diferencias significativas entre ambos valores ($p<0,05$) ($n= 5$) (figura 6).

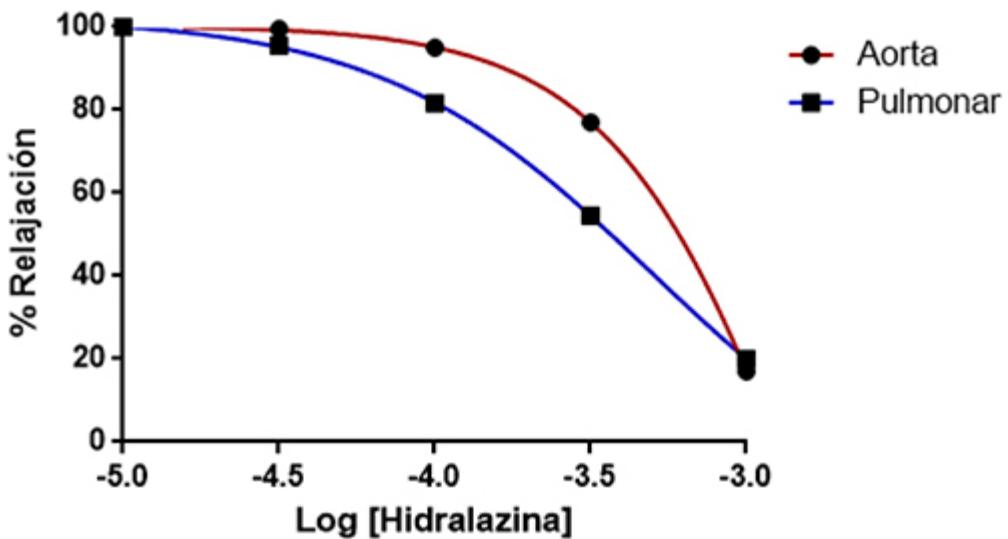


Figura 6. Curvas de dosis respuesta a la hidralazina en anillos de arterias pulmonar y aorta de la rata, utilizando NE (1×10^{-7} M) como contracturante. En la arteria pulmonar, la máxima relajación inducida por 1×10^{-3} M de hidralazina fue del 79,9% y la CI₅₀ de $2,34 \times 10^{-4}$ M. En la aorta, la máxima relajación producida a la misma concentración fue del 82,85% y la CI₅₀ de $5,24 \times 10^{-4}$ M, encontrándose diferencias significativas entre ambos valores ($p<0,05$) ($n= 5$).

Curvas de dosis respuesta a la hidralazina estimulada por KCl= 40 mM en las arterias pulmonar principal y aorta de la rata.

Como se observa en la figura 7, cuando se estimuló con KCl= 40 mM, la hidralazina produjo una relajación dependiente de la dosis en ambas arterias. En la arteria pulmonar la máxima relajación (93%) se obtuvo con una concentración de 1×10^{-3} M de hidralazina y la CI₅₀ fue de $1,86 \times 10^{-4}$ M ($n= 8$). En la aorta, se obtuvo la relajación máxima (99,32%) a la misma concentración que la pulmonar, con una CI₅₀ de $3,16 \times 10^{-4}$ M ($n= 7$), encontrándose diferencias significativas entre ambos valores ($p<0,05$).

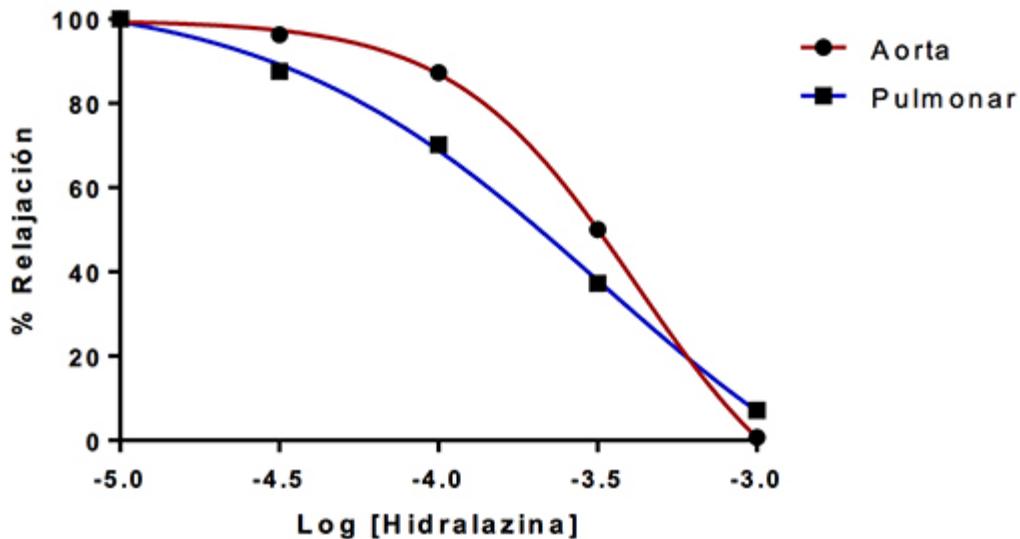


Figura 7. Curvas de dosis respuesta a la hidralazina en anillos de arterias pulmonar y aorta de la rata, utilizando KCl= 40 mM como contracturante. En la arteria pulmonar, la máxima relajación inducida por 1×10^{-3} M de hidralazina fue del 92,9% y la CI50 de $3,2 \times 10^{-4}$ M. En la aorta, la máxima relajación producida a la misma concentración fue del 100% y la CI50 de $4,2 \times 10^{-4}$ M, sin significativas entre ambos valores.

Efecto del pretratamiento con hidralazina sobre la respuesta contráctil inducida por concentraciones crecientes de NE:

En la figura 8 se muestra la respuesta contráctil de las arterias pulmonar y aorta de la rata (figura 9) a concentraciones crecientes de NE 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M en ausencia y presencia de hidralazina (5×10^{-4} M) como porcentaje de la respuesta máxima obtenida con 40 mM de KCl. En la arteria pulmonar, en presencia de hidralazina se desplazó la curva de dosis respuesta hacia la derecha 3,55 veces, con una DE50 control de 7×10^{-9} M y en presencia de hidralazina de $7,1 \times 10^{-8}$ M, sin cambios significativos en la respuesta máxima. En la aorta, la DE50 control fue de $8,4 \times 10^{-9}$ M y en presencia de hidralazina de $2,45 \times 10^{-8}$ M (n= 5), desplazándose hacia la derecha 21 veces ($p < 0,01$).

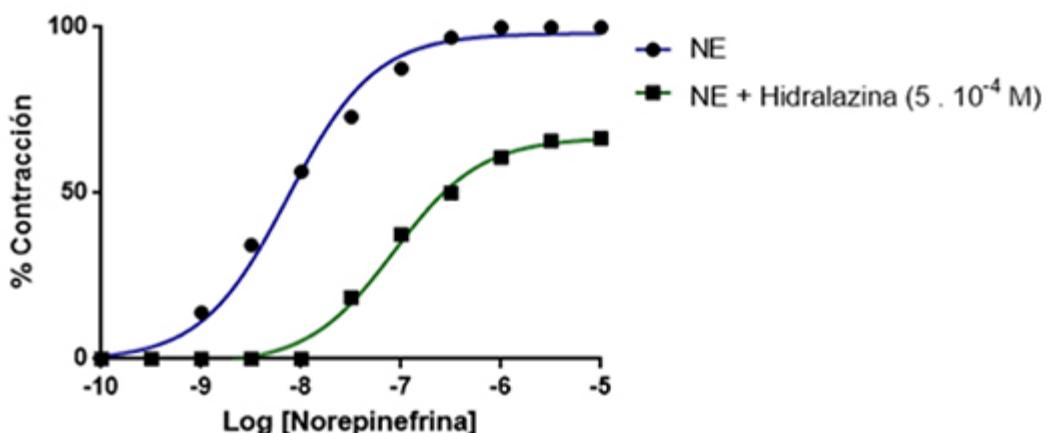


Figura 8. Curva de dosis respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de hidralazina (5×10^{-4} M) en anillos de arteria pulmonar de la rata. La hidralazina produjo un desplazamiento de la curva de dosis respuesta a la NE de 11,5 veces ($p<0,05$) con una DE50 control de $7,4 \times 10^{-9}$ M y en presencia de verapamil de $8,5 \times 10^{-8}$ M, con una disminución significativa de la respuesta máxima de un 33,5% ($p<0,05$).

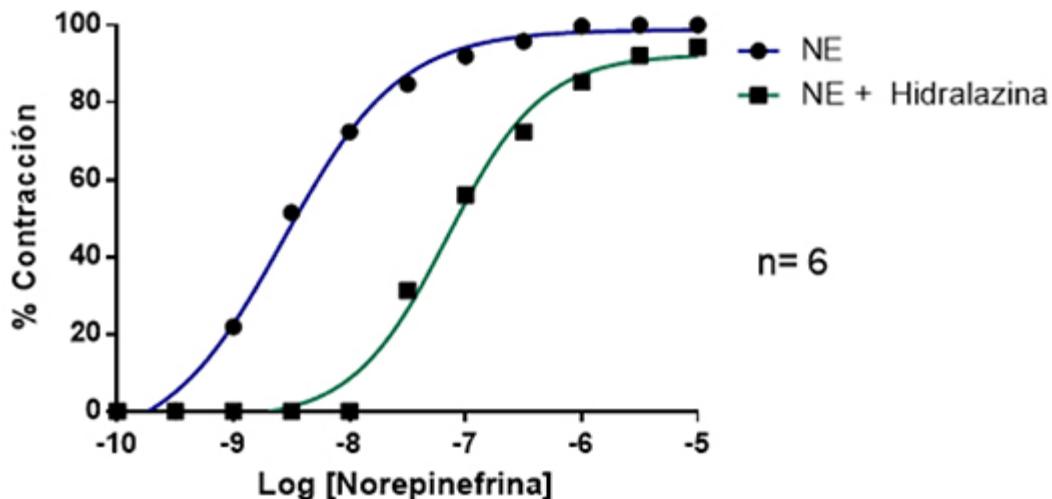


Figura 9. Curva de dosis respuesta a la norepinefrina en ausencia y en presencia de hidralazina (5×10^{-4} M) en anillos de aorta de la rata. La hidralazina produjo un desplazamiento de la curva de dosis respuesta a la NE de 26 veces ($p<0,05$) con una DE50 control de $2,7 \times 10^{-9}$ M y en presencia de verapamil de 7×10^{-8} M, sin cambios significativos en el efecto máximo.

Efecto del hidralazina sobre la contracción obtenida por concentraciones crecientes de calcio en preparaciones despolarizadas:

En una solución de Krebs-Henseleit libre de calcio y alta en K+, la adición acumulativa de CaCl₂ (1×10^{-5} M, hasta 5×10^{-3} M), produjo en las arterias pulmonar (figura 10) y aorta de la rata (figura 11) un incremento en la respuesta contráctil dosis dependiente. En la arteria pulmonar, el pretratamiento con hidralazina produjo una disminución significativa de la contracción inducida por el CaCl₂, con una DE50 control de $3,2 \times 10^{-4}$ M ($n=5$) y de $1,23 \times 10^{-3}$ M en presencia de hidralazina ($p<0,05$), disminuyéndose el efecto máximo en presencia de hidralazina en un 17,15% ($p<0,05$). El pretratamiento de la aorta con hidralazina (5×10^{-4} M) durante 30 minutos produjo una disminución significativa de la contracción inducida por el CaCl₂, con una DE50 control de $3,3 \times 10^{-4}$ M ($n=8$) y de $9,5 \times 10^{-4}$ M luego del pretratamiento con hidralazina ($p<0,05$) ($n=8$), disminuyéndose el efecto máximo en presencia de hidralazina en un 17,15% ($p<0,05$).

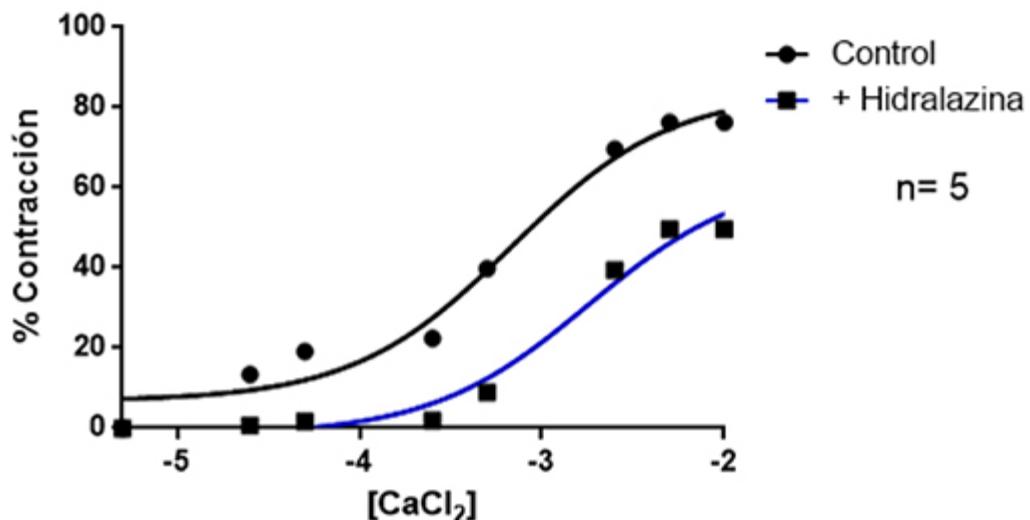


Figura 10. Curvas de dosis respuesta al CaCl₂ en ausencia y en presencia de hidralazina (5×10^{-4} M) en anillos de arteria pulmonar principal de la rata. En la arteria pulmonar, el pretratamiento con hidralazina produjo una modificación significativa de la contracción inducida por el CaCl₂ de 3,9 veces, con una DE50 control de $3,2 \times 10^{-4}$ M (n=5) y de $1,23 \times 10^{-3}$ M en presencia de hidralazina ($p<0,05$), disminuyéndose el efecto máximo en presencia de hidralazina en un 26,72% ($p<0,05$).

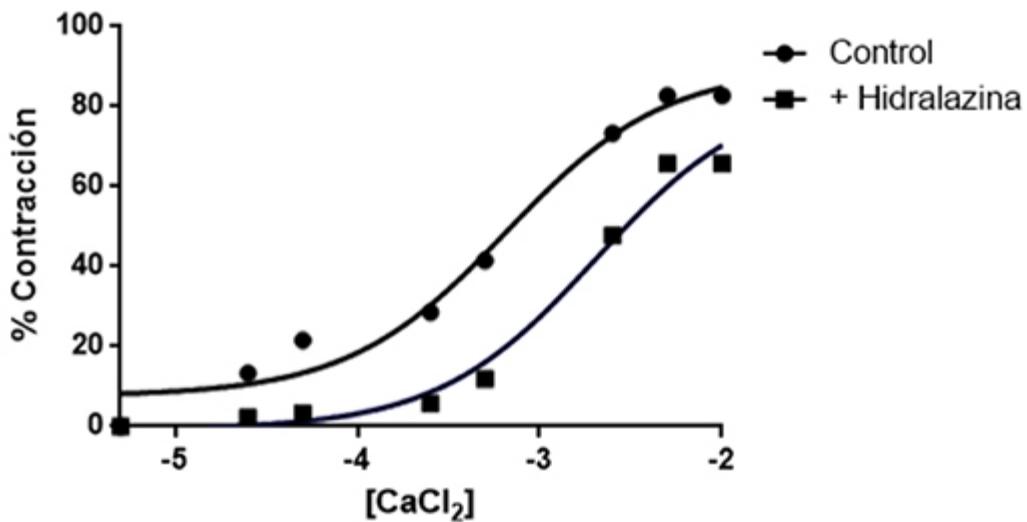


Figura 11. Curvas de dosis respuesta al CaCl₂ en ausencia y en presencia de hidralazina (5×10^{-4} M) en anillos de aorta de la rata. En la aorta, el pretratamiento con hidralazina produjo una modificación significativa de la contracción inducida por el CaCl₂ de 2,9 veces, con una DE50 control de $3,3 \times 10^{-4}$ M (n=8) y de $9,5 \times 10^{-4}$ M en presencia de hidralazina ($p<0,05$), disminuyéndose el efecto máximo en presencia de hidralazina en un 17,15% ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

Algunos factores como las propiedades fisicoquímicas del agonista (estructura química),

liposolubilidad, la concentración alcanzada en la biofase y el mecanismo mediante el cual el vaso sanguíneo es activado (por despolarización o por agonistas), pueden influir sobre el efecto de antagonistas sobre un lecho vascular en particular. Asimismo, es ampliamente aceptado que existen diferentes variaciones fisiológicas entre distintos vasos sanguíneos del mismo animal y entre el mismo lecho vascular de diferentes especies. Esto ha sido demostrado por la existencia de una diversidad de respuestas a algunos agonistas (10, 11, 12) y por la variabilidad encontrada en la densidad de diferentes receptores y canales iónicos entre diferentes vasos sanguíneos. (1, 13, 14)

Cuando comparamos dos lechos arteriales que manejan diferentes presiones con la acción de agentes vasodilatadores que modulan el movimiento de calcio intracelular se encontraron diferencias importantes. Al analizar el efecto del verapamil, Meisheri y col. (15) determinaron que el efecto de los antagonistas de calcio sobre la respuesta contráctil del músculo liso vascular y la entrada de Ca⁺² cuando se exponía al tejido a soluciones con alto K⁺, estaba relacionado con el calibre de la arteria. Las grandes arterias tienen una mayor sensibilidad a los antagonistas del calcio cuando se estimula la contracción por despolarización con alto K⁺ que durante la activación con norepinefrina (16). En nuestros experimentos observamos que cuando se estimuló con NE, se presentó una mayor sensibilidad al verapamil en la arteria pulmonar que en la aorta, posiblemente en esta última se pudiera presentar una contracción más dependiente de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RS) y en la arteria pulmonar en cambio una mayor acción del agonista sobre la membrana plasmática y por lo tanto, mayor respuesta al vasodilatador. Podría encontrarse en la arteria pulmonar principal de la rata una mayor densidad de ROC que en la aorta. En concordancia con nuestros resultados Van Breemen y col. (17) y Cauvin y col. (18) demostraron que las contracciones inducidas por alto potasio (que se relacionan más con la entrada de calcio del medio extracelular), parecen presentar igual sensibilidad a los antagonistas del calcio en diferentes vasos sanguíneos. Cuando estudiamos el efecto del verapamil en prevenir la contracción inducida por concentraciones crecientes de NE, se presentó una mayor sensibilidad en la arteria pulmonar. Esta diferencia pudiese estar relacionada con una contribución diferente de los mecanismos que mantienen la contracción como podría ser, la entrada de calcio por el plasmalema, liberación de calcio por el RS, o diferencias en los mecanismos de recaptación de calcio o los relacionados con su liberación por el RS. De acuerdo a los mecanismos actualmente propuestos la principal fuente de Ca⁺² intracelular es su salida del retículo sarcoplásmico (RS) y la disminución del citoplasma sería su recaptación por la SERCA del RS. (25, 26) . El verapamil como bloqueante de calcio por los canales tipo L, por su mecanismo de acción debería disminuir las contracciones inducidas por agonistas o soluciones despolarizantes, por lo tanto nuestros resultados eran de esperar, en ambas arterias. Así mismo su respuesta no parece estar relacionada con sustancias liberadas del endotelio, puesto que la ausencia del mismo no modificó las respuestas observadas (datos no mostrados).

A diferencia de lo observado con el verapamil, el efecto vasodilatador de la hidralazina en las arterias pulmonar y aorta de la rata fue observado a concentraciones muy altas de este agente, lo que está de acuerdo con experimentos realizados por Mclean y col. (19) quienes en tiras de aorta de conejo requirieron una concentración de 3 x 10⁻⁴ M de hidralazina para alcanzar un pequeño grado de relajación cuando se estimulaba con NE. El hecho que para

poder observar el efecto *in vitro* de la hidralazina se requiera altas concentraciones de la misma, posiblemente no refleje su efecto vasodilatador en el humano, puesto que se han reportado niveles séricos entre 1×10^{-7} a 1×10^{-6} M, luego de la administración oral de dosis terapéuticas de hidralazina (20). Al analizar el efecto de la hidralazina sobre las contracciones inducidas por $KCl = 40$ mM y NE, se mostró una mayor respuesta cuando se contrajo por despolarización, lo que podría estar relacionado con un mayor almacenamiento de calcio cuando se estimula por despolarización, aunque independientemente del modo de estimulación hubo mayor susceptibilidad a la respuesta vasodilatadora en la arteria pulmonar. Por otra parte Orallo y col. (21) encontraron resultados similares a los nuestros en aorta de rata donde la hidralazina en un rango de concentraciones de 1×10^{-4} M a 1×10^{-2} M inhibió las contracciones inducidas por NE ($10 \mu M$) y $KCl = 60$ mM de una manera similar. Sin embargo, Gurney y Allam (22) reportaron resultados diferentes en aorta de conejo, donde al estimular con KCl tuvieron menor efecto que cuando lo hacían con felinefrina, un agonista alfa 1 adrenérgico. Posiblemente estas diferencias estén relacionadas con el tiempo de exposición de la hidralazina a las preparaciones o por el hecho de utilizar altas concentraciones de esta.

Cuando analizamos el efecto de la hidralazina en prevenir la contracción inducida por concentraciones crecientes de NE, se observó, a diferencia de los encontrado en la aorta, una disminución significativa de la respuesta máxima a mayores concentraciones del agonista, posiblemente altas concentraciones de hidralazina contribuyan a un mayor almacenamiento de calcio en el RS en la arteria pulmonar, o a una menor liberación del mismo.

Un importante hallazgo fue el hecho de observar que la hidralazina disminuía la contracción inducida por concentraciones crecientes de calcio en solución despolarizante en ambas arterias, con una tendencia de mayor efecto en la aorta, lo que sugiere que en esta arteria, la hidralazina disminuiría mayormente la entrada de calcio por el sarcolema. Aunque no hay ningún trabajo en la literatura que respalde el papel de los ROC o VOC en estas arterias, pensamos que cuando se induce la apertura de los ROC por agonistas, la respuesta de este agente dependería menos del calcio extracelular, mientras que cuando se estimula por despolarización, la entrada del calcio por los VOC presentaría una mayor dependencia del calcio extracelular. Mclean y col (19) en tiras de aorta de conejo observaron resultados similares incluyendo la disminución del efecto máximo al utilizar concentraciones crecientes de NE. Podemos destacar que durante la contracción sostenida, la concentración citoplasmática de calcio depende de la frecuencia relativa de captación y liberación del mismo, así como de su salida y entrada por el sarcolema, lo que implicaría que dichos mecanismos podrían presentar una magnitud diferente en la arteria pulmonar principal con respecto a la aorta. Otra evidencia importante es que el efecto de la hidralazina no parece estar relacionado con sustancias liberadas del endotelio, puesto que el efecto relajante fue similar al observado en su presencia (datos no mostrados), lo que apoya lo observado por Gurney y Allan (22) y Yen y col (23).

En conclusión, la aorta dependería más para su contracción de los mecanismos de liberación de calcio del RS, mientras la arteria pulmonar dependería más de los mecanismos de entrada del mismo por el sarcolema, pudiendo afectar la hidralazina preferencialmente a los ROC en la arteria pulmonar, que modularían más la respuesta contráctil en esta arteria, siendo su efecto mayor en el músculo liso vascular que en el endotelio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Latif, A. 1986. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38: 227-272
2. Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB.* 9: 484-496
3. Allen, B. and Walsh, M. 1994. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem. Sci.* 19: 362-368
4. Winder, S; Allen, B. Clement-Chomienne, O. and Walsh, M. 1998. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiol. Scan.* 164: 415-426
5. Walsh, M. 1994. Regulation of vascular smooth muscle tone. *Can. J. physiol. Pharmacol.* 72: 919-936
6. Rembold, C. 1992. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension.* 20: 129-137.
7. Ruegg, J. 1999. Smooth muscle: PKC-induced Ca^{2+} sensitization by myosin phosphatase inhibition. *J. Physiol.* 520: 3.
8. Takuwa, Y. 1996. Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca^{2+} , protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Jpn Heart J.* 37: 793-813
9. Furchtgott, R. and Zawadzki, J. 1980. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-376
10. Van Breemen, C. 1977. Calcium requirement for activation of intact aortic smooth muscle. *J. Physiol.* 272: 317-329
11. Vanhoutte, P. and Miller, V. 1989. Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Med.* 87(Suppl. 3C): 1S-5S
12. Koch, P.; Wilffert, B.; Wilhelm, D. and Peters, T. 1990. An approach to differentiate between noradrenaline-elicited contractile processes in the rat isolated aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 454-461
13. Han, C., Abel, P. and Minneman, K. 1987. Heterogeneity of alpha-1 adrenoceptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* 32: 505
14. Harrison, J.; Pearson, W. and Lynch, K. 1991 X Molecular characterization of alpha 1 and alpha 2-adrenoceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 62-67
15. Meisheri, K.; Hwang, O. and Van Breemen, C. 1981 X Evidence for two separate Ca^{2+} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J. Memb. Biol.* 59: 19-25
16. Vaghy, P.; Williams, J. and Schwarzt, A. 1987. Receptor Pharmacology of calcium entry blocking agents. *A. J. Cardiol.* 59: 9A-17A
17. Van Breemen, C; Hwang, O. and Meisheri, D. 1981 X The mechanism of inhibitory action of diltiazem on vascular smooth muscle contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218(2): 459-463
18. Cauvin, C. Loutzenhiser, R. and Van Breemen, C. 1983. Mechanism of calcium antagonist-induced vasodilation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 373-396
19. Mclean, A.; Du Souich, P.; Barron, K. and Briggs, A. 1978. Interaction of hydralazine with tension development and mechanism of calcium accumulation in K^+ stimulated rabbit aorta strips. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 40-48
20. Sheperd, A.; Haegele, K.; Ludden, T.; Talseth, T. Clementi, W. and McNay, J. 1979.

Hydralazine disposition following a single oral dose in human volunteers (Abstract). Clin. Res. 27: 318

21. Orallo, F.; Gil-longo, J.; Bardan, B. and Calleja, J. 1991 X Comparison of the effects of hydralazine and nifedipine on contractions and ^{45}Ca influx of rat aorta. J. Pharm. Pharmacol. 43: 356-359.
22. Gurney, A. and Allan, M. 1995. Inhibition of calcium release from the reticulum of rabbit aorta by hydralazine. Br. J. Pharmacol. 114: 238
23. Yen, M.; Wu, C.; Chiou, W. and Liao, C. 1989. Effect of hydralazine of guanosine cyclic 3â€™, 5â€™-monophosphate levels in rat aorta. Proc. Natl. Sci. Counc. B. Rep. China. 13: 83
24. Mandegar, M., Fung, Y., Huang, W., Remillard, C., Rubin, L. and Yuan, J. 2004. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. Microvascular Res. 68: 75â€“ 103
25. Smajilovic, S., Hansen, J., Christoffersen, T., Lewin, E., Sheikh, S., y col, 2006. Extracellular calcium sensing in rat aortic vascular smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 348: 1215â€“1223
26. Rocha, M and Bendhack, L. 2009. Relaxation evoked by extracellular Ca^{2+} in rat aorta is nerve-independent and involves sarcoplasmic reticulum and L-type Ca^{2+} channel. Vascular Pharmacology. 50: 98â€“103
27. Medarov, B. and Judson, M. 2015. The role of calcium channel blockers for the treatment of pulmonary arterial hypertension: How much do we actually know and how could they be positioned today? Respiratory Medicine. 109: 557-564