

Caracterización farmacológica de la respuesta vascular a bradikina en vasos de resistencia

ROBERTO MIATELLO, TERESA DAMIANI, LEONOR VARGAS, HECTOR NOLLY

Laboratorio de Hipertensión Experimental y Sustancias Vasoactivas, Cátedra de Fisiología Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, Mendoza, Argentina

Trabajo recibido para su publicación: 11/94 Aceptado: 11/94

Dirección para separatas: Dr. Roberto Miatello, Cátedra de Fisiología Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Avda. Libertador 80, Centro Universitario, (5500) Mendoza, Argentina

Las kininas son hormonas vasoactivas que participarían como un sistema paracrino en la regulación local del flujo sanguíneo. La bradikina inyectada posee una acción bifásica: vasodilatación seguida de vasoconstricción (Fasciolo y Nolly, 1990). El presente estudio examina los posibles mecanismos involucrados en dicha acción. La arteria mesentérica de rata fue canulada, perfundida con solución salina fisiológica (4 ml/min) y contraída con noradrenalina (10^{-5} M— 10^{-6} M). La respuesta a los agonistas se midió por las variaciones en la presión de perfusión. Cuando la presión de perfusión basal se mantuvo entre 30 y 60 mmHg, la bradikina produjo una pequeña dilatación, seguida por una gran vasoconstricción. Con una presión entre 70 y 100 mmHg, se observó predominantemente vasodilatación. El L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa y el clotrimazol (10^{-8} M), un inhibidor de la citocromo P-450, redujeron significativamente ($p < 0,005$) la respuesta a la bradikina. La indometacina (1 µg/ml), un inhibidor de la ciclooxigenasa, abolió completamente el efecto vasoconstrictor y sólo parcialmente la respuesta vasodilatadora. La vasoconstricción inducida por bradikina se redujo además significativamente ($p < 0,001$) en presencia de SQ-29548, un bloqueante de receptores para PGH_2/TXA_2 . Los resultados obtenidos confirman que la inyección de bradikina en vasos mesentéricos produce vasodilatación seguida de vasoconstricción, variando la magnitud del efecto bifásico con los niveles de presión de perfusión. La relajación tiene dos componentes principales (mediados por óxido nítrico y citocromo P-450) y uno menor (mediado por prostanoïdes); en tanto que en el efecto vasoconstrictor participarían metabolitos del ácido araquidónico, posiblemente endoperóxidos cíclicos y/o tromboxanos. *Rev Arg Cardiol* 1995; 63 (2): 103-108.

Palabras clave Bradikina - Arterias mesentéricas - Indometacina - L-nitro arginina - Clotrimazol

El sistema kalikreína-kininas está integrado por enzimas del tipo de las serinproteasas que producen la separación de sustratos proteicos denominados kininógenos y cuyos productos, las kininas, son péptidos con potente acción vasodilatadora. Nuestro laboratorio ha descrito la presencia de kalikreína tisular en arterias y venas. (1) También se ha demostrado la existencia del ácido ribonucleico mensajero codificando la síntesis de kalikreína a este nivel. (2) Las kininas formadas por este sistema a nivel vascular —kininas vasculares— podrían ejercer su acción en el mismo sitio de síntesis o cerca del mismo, actuando como hormonas autocrinas/paracrinas, dado que aun cuando presentan un potente efecto vasodilatador, su concentración en plasma no alcanza los

valores necesarios como para desarrollar esta acción y son rápidamente metabolizadas por peptidasas conocidas como kininasas, entre ellas la enzima convertidora de angiotensina. (3)

Si bien la respuesta a la bradikina se manifiesta a través de vasodilatación sistémica y disminución de la presión sanguínea, algunos estudios han demostrado que también puede incrementar la presión arterial, o ejercer una acción bifásica. En varios lechos arteriales la bradikina provoca relajación. (4) En el lecho vascular mesentérico de la rata relaja arterias y contrae las venas. (5) En riñón aislado y arteria de la oreja de conejo induce vasoconstricción. (6)

En nuestro laboratorio observamos que en el preparado mesentérico aislado, precontraído con nora-

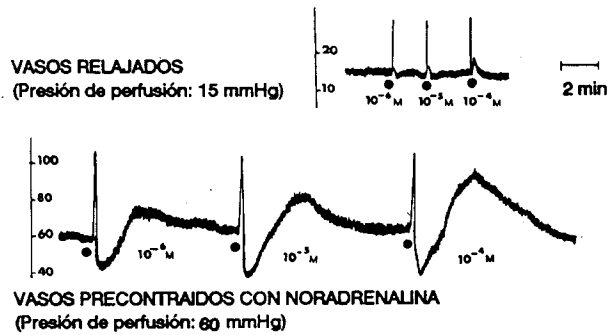


Fig. 1. Registro del efecto de la inyección en bolo de bradikina en el preparado aislado de arteria mesentérica.

drenalina y perfundido con solución salina fisiológica, la bradikina provoca una respuesta bifásica: inicialmente vasodilatación, seguida de una vasoconstricción dosis-dependiente. (7)

Se ha postulado que el efecto vasodilatador de las kininas podría estar mediado por sustancias sintetizadas en el endotelio vascular, entre las cuales se mencionan derivados del ácido araquidónico y el factor relajante endotelial. (8) Con respecto al efecto vasoconstrictor, éste podría deberse a metabolitos del ácido araquidónico, dado que es bloqueado por inhibidores de la ciclo-oxigenasa. (7)

Con el objetivo de caracterizar farmacológicamente la respuesta a la bradikina en los vasos de resistencia, se diseñaron protocolos para observar su efecto sobre el lecho vascular mesentérico de rata perfundido con solución salina fisiológica y precontraído con noradrenalina en presencia de inhibidores específicos:

- a) Indometacina, inhibidor de la ciclo-oxigenasa y de la síntesis de metabolitos derivados de esta vía. (9)
- b) SQ 29548, antagonista de receptores tromboxano A₂/endoperoxido H₂
- c) UK 38485, inhibidor de la síntesis de tromboxanos.
- d) L-nitro arginina metil éster, inhibidor de la síntesis de factor relajante endotelial, descrito como óxido nítrico. (10)
- g) Clotrimazol, bloqueante de la citocromo P-450 monooxigenasa y de la formación de lipoxinoides a partir del ácido araquidónico.

MATERIAL Y METODO

El preparado biológico empleado es el lecho vascular mesentérico de rata Wistar macho, de 300 gramos de peso, previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg IP). Se canuló la arteria mesentérica anterior y se disecó el mesenterio hasta el borde intestinal de modo de abarcar las arteriolas precapilares, según la técnica descrita por McGregor. (11).

La cánula se conectó a una bomba de infusión con-

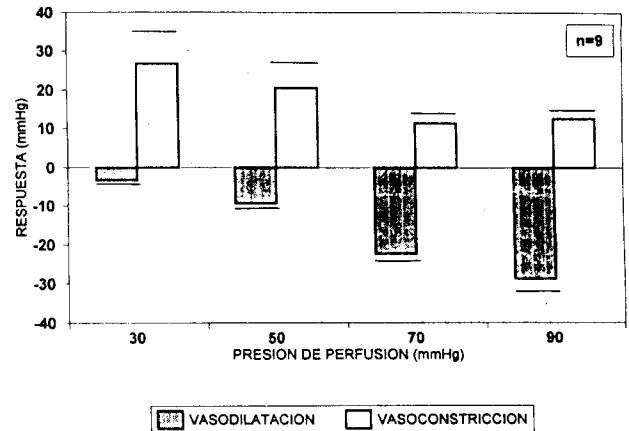


Fig. 2. Efecto de una misma dosis de bradikina a diferentes presiones de perfusión. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

tinua, a un caudal de 3-4 ml/min, con el objeto de mantener una presión de perfusión basal de 12 a 15 mmHg. El sistema se comunicó, a nivel de la entrada de la cánula a la arteria, a un sistema de transducción de presión a señal electrónica Statham Transducer P2 3AC, registrándose permanentemente las variaciones en forma gráfica y con monitor electrónico.

El preparado vascular fue ubicado sobre una plataforma termostata a 37°C y se perfundió con solución salina fisiológica, cuya composición es la siguiente, en mM: ClNa: 134; ClK: 5; Cl₂Ca: 0,6; Cl₂Mg: 0,8; PO₄HNa₂: 5; PO₄H₂NA: 0,5; glucosa: 5. La osmolaridad fue 285 mOsm/l y el pH = 7,45. La solución fue gaseada con carbógeno y mantenida a 37°C mediante un baño termostata de circulación continua.

Dado que el caudal proporcionado por la bomba es constante, los cambios en la presión de perfusión son demostrativos de las variaciones del tono vascular muscular, que altera la resistencia del circuito al pasaje del líquido. Los resultados son medidos como variación máxima de la presión de perfusión en mmHg inmediatamente después de cada inyección.

El preparado fue lavado con solución salina fisiológica y perfundido durante 30-40 minutos hasta la estabilización de los valores de presión de perfusión. A partir de ese momento se probaron las respuestas a los agonistas. Se perfundió con noradrenalina en solución de 10⁻³ M, inyectada a la salida de la bomba impulsora con una bomba de infusión Harvard, a un ritmo de 0,1-0,2 ml/min, de manera de provocar aumentos estables en la presión basal.

La bradikina, disuelta en la misma solución de perfusión, en concentración de 10⁻⁵ M, se inyectó en un bolo de 50 μ l con una microjeringa a través de la cánula insertada en la arteria. La inyección de igual volumen de solución salina provoca un artificio en

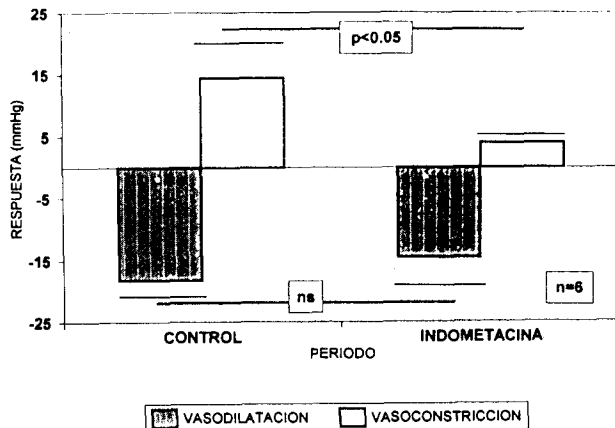


Fig. 3. La infusión con indometacina (1 $\mu\text{g/ml}$) abolió el efecto vasoconstrictor ($p < 0,05$), sin alterar significativamente el efecto vasodilatador. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

el registro de presión, que no es tenido en cuenta como respuesta de los vasos.

Se examinó la reactividad de este preparado en presencia de inhibidores específicos; para ello se agregó a la solución de perfusión las siguientes drogas, en la concentración indicada:

- Indometacina: 1 $\mu\text{g/ml}$.
- SQ 29548: 4 $\mu\text{g/ml}$.
- UK 38485: 8 $\mu\text{g/ml}$.
- L-nitroarginina metil éster: 10^{-4}M .
- Clotrimazol: 10^{-8}M .

Las concentraciones seleccionadas para cada inhibidor corresponden a las efectivas sobre la respuesta a la bradikinin y no afectan la reactividad vascular frente a otros agonistas vasoactivos utilizados como control.

Las drogas usadas son: (-)noradrenalina D-bitartrato (Sterling-Wintrop), indometacina (Sigma); bradikinin triacetato (Sigma); UK 38485 (ácido 3-1H-imidazol-1-yl-metil-1H-indol-1-propanoico) (Pfizer); SQ 29548 (ácido 15-[1 α .2 β (5Z),3 β 4 α]-7-[3-[2-[9-fenilamino carbonil] hidrazinometil]-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il]heptenoico) (Squibb); clotrimazol (Sigma), L-nitro arginina metil éster (Sigma). Los reactivos usados para la preparación de soluciones son de pureza pro-análisis.

Los resultados fueron procesados estadísticamente mediante análisis de la varianza, estableciéndose para la aceptación de diferencias significativas, un nivel de significación menor a 0,05. Los datos se expresan como media aritmética \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

La bradikinin inyectada en bolo en el preparado mesentérico relajado no produce respuestas aprecia-

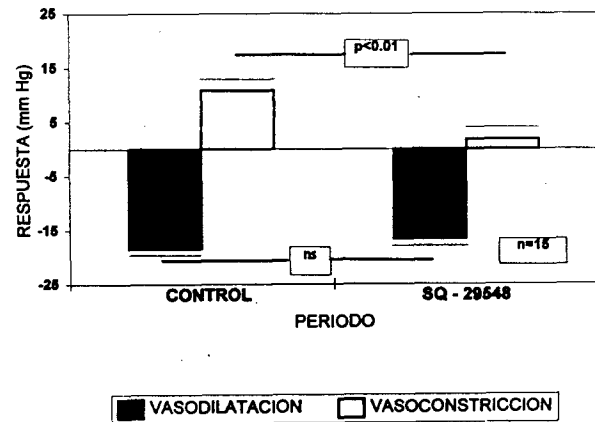


Fig. 4. El bloqueo de receptores para $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ con SQ-29548 redujo significativamente el efecto vasoconstrictor ($p < 0,001$) sin alterar el efecto vasodilatador. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

bles, en tanto que si los vasos son precontraídos con noradrenalina se verifica una respuesta bifásica dosis-dependiente (Figura 1).

Esta respuesta bifásica presenta variaciones de acuerdo con la presión basal de perfusión obtenida por la adición de noradrenalina a la solución. La Figura 2 muestra que el aumento en la presión basal se correlaciona en forma directa con la amplitud de la respuesta vasodilatadora y en forma inversa con el efecto vasoconstrictor.

Se seleccionó un nivel de presión basal de 70 ± 5 mmHg para los protocolos en los que se ensayó el efecto de inhibidores específicos, dado que permite la observación de ambos efectos, relajación y constricción.

El desarrollo lento de la respuesta a la bradikinin sugiere que podría estar involucrado un mediador generado localmente. Dado que se conoce que las kininas liberan prostaglandinas en los vasos sanguíneos, se probó el efecto de inhibidores de la ciclooxigenasa sobre la respuesta inducida por bradikinin. La infusión con indometacina (1 $\mu\text{g/ml}$) abolió el efecto vasoconstrictor ($p < 0,05$), sin alterar significativamente el efecto vasodilatador (Figura 3).

El bloqueo de los receptores para $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ con SQ-29548 redujo significativamente el efecto vasoconstrictor ($p < 0,001$) sin alterar el efecto vasodilatador (Figura 4). La inhibición de la tromboxanosintetasa con UK-38485 disminuyó la respuesta vasoconstrictora a bradikinin ($p < 0,001$) sin modificar la respuesta vasodilatadora (Figura 5).

La inhibición de la óxido-nítrico-sintetasa mediante la utilización de un inhibidor competitivo de esta enzima, L-nitro arginina metil éster, requirió un tiempo de latencia de 45 minutos hasta verificarse una reducción significativa ($p < 0,005$), aunque no com-

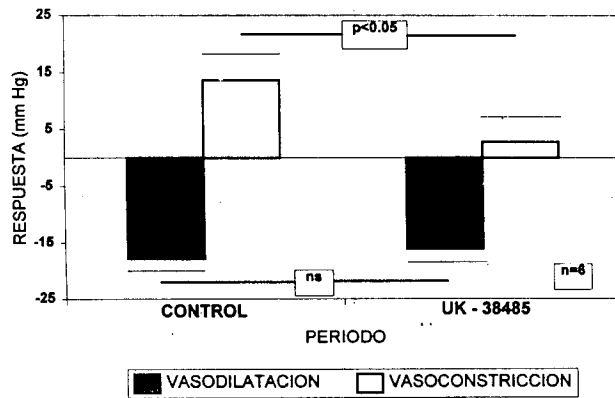


Fig. 5. La inhibición de la tromboxano-sintetasa con UK-38485 disminuyó la respuesta vasoconstrictora a bradikina ($p < 0,001$) sin modificar la respuesta vasodilatadora. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

pleta, de la vasodilatación inducida por bradikina (Figura 6).

El clotrimazol disminuyó significativamente ($p < 0,0025$) la vasodilatación inducida por la bradikina (Figura 7).

DISCUSION

En el presente estudio se ha investigado el mecanismo de la respuesta inducida por la bradikina en las arterias de resistencia, en este caso el lecho arterial mesentérico de rata, precontraído previamente con noradrenalina.

El flujo sanguíneo depende del tono del músculo liso vascular, que es mantenido por la acción conjunta de una serie de factores, que incluyen factores humorales (endocrinos), nerviosos y tisulares locales (autocrinos-paracrinos).

Los sistemas hormonales autocrinos y/o paracrinos regulan la función tisular en el sitio donde se liberan o cerca del mismo, pero en la homeostasis vascular su papel no ha sido aún totalmente aclarado. Los tejidos presentan una habilidad intrínseca para regular el flujo sanguíneo local, dependiendo de sus necesidades metabólicas; si el flujo es insuficiente para las necesidades tisulares se produce vasodilatación, en tanto que si es excesivo ocurre una constricción arteriolar. Este proceso de control local del flujo sanguíneo se denomina autorregulación.

Las sustancias vasoactivas que actúan como sistemas hormonales locales, endocrinos o neurocrinos, juegan un papel importante en la regulación de la presión arterial. Estos factores interactúan en un complejo mecanismo a fin de mantener la homeostasis vascular.

La perfusión de los tejidos es el papel primario de la circulación. El corazón genera la fuerza requerida para propulsar la sangre a través de los vasos perifé-

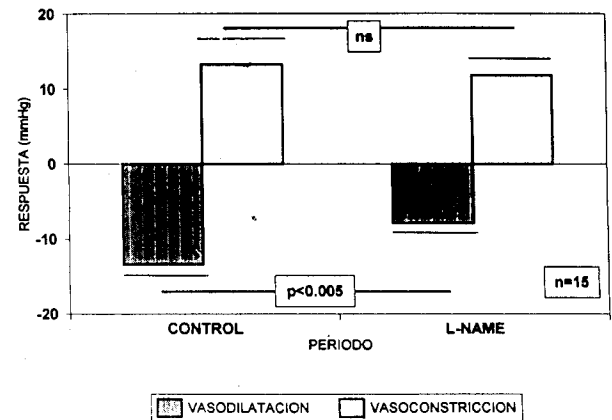


Fig. 6. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico con L-nitro arginina metil éster produjo una reducción significativa ($p < 0,005$), aunque no completa, de la vasodilatación inducida por bradikina. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

ricos y debe proveer un volumen adecuado para las demandas del organismo.

Algunos sistemas vasopresores, tales como el sistema renina-angiotensina y las catecolaminas, pueden actuar tanto como sistemas hormonales endocrinos o locales, mientras otros, como los eicosanoides y la endotelina, actúan principalmente como hormonas locales. (12, 13) Las hormonas vasopresoras pueden causar hipertensión incrementando el gasto cardíaco o aumentando la resistencia vascular mediante vasoconstricción, proliferación e hipertrofia del músculo liso.

Algunos sistema vasodepresores, como el factor natriurético atrial, pueden actuar tanto como sistemas endocrinos o locales; otros, como las kininas, los factores relajantes derivados del endotelio (EDRF) y

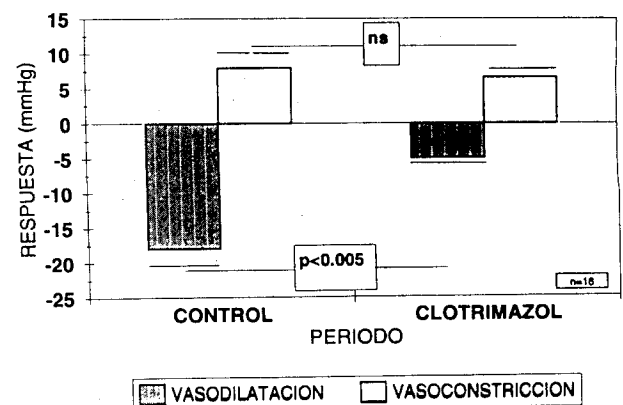


Fig. 7. El clotrimazol disminuyó significativamente ($p < 0,0025$) la vasodilatación inducida por bradikina. Los valores graficados corresponden a media aritmética \pm error estándar de la media.

las prostaciclina, pueden actuar como hormonas locales. (14)

El sistema kalikreína-kininas ha sido postulado como uno de los sistemas vasodiladores capaces de contrabalancear los efectos de los sistemas vasoconstrictores. (3)

Las kininas son péptidos con potente efecto vasodilatador que actúan principalmente como hormonas locales, debido a que circulan en bajas concentraciones y son rápidamente hidrolizadas por las kininasas.

Los mecanismos por los cuales la bradikina desarrolla su respuesta no son bien conocidos. Este trabajo demuestra que en ciertos territorios la bradikina puede contribuir en la autorregulación vascular, ya que se observa una correlación directa entre el efecto vasodilatador y la presión de perfusión basal a la que se someten los vasos. Esta correlación se invierte cuando se analiza su efecto vasoconstrictor.

El desarrollo lento de la respuesta vasoconstrictora a la inyección de bradikina sugiere que podría estar involucrado un mediador generado localmente. La infusión con indometacina, inhibidor de la síntesis de prostanoïdes derivados de la ciclooxigenasa, abolió el efecto vasoconstrictor sin alterar significativamente el efecto vasodilatador. El bloqueo de receptores para TXA_2/PGH_2 con SQ-29548 redujo significativamente el efecto vasoconstrictor. Efecto semejante se obtuvo mediante la utilización de un inhibidor de la tromboxano-sintetasa, UK-38485. En trabajos previos también hemos comprobado que la cicletanina, una furopiridina utilizada en tratamiento antihipertensivo, modifica solamente la acción vasoconstrictora. (15) Estas observaciones sugieren que este efecto puede estar mediado por prostanoïdes, posiblemente tromboxano A_2 o endoperóxidos cíclicos (PGH_2). Se ha observado además que las kininas pueden producir contracción de la musculatura lisa a otros niveles mediante la formación de tromboxanos.

La actividad vasodilatadora inducida por bradikina en estos vasos podría tener al menos tres componentes: uno nítrico-dependiente, otro óxido nítrico-independiente (citocromo P-450) y, por último, los eicosanoïdes cíclicos como un componente menor. Esta hipótesis puede apoyarse en las observaciones realizadas en este trabajo: el efecto vasodilatador es afectado significativamente por la infusión con un inhibidor de la óxido-nítrico-sintetasa, L-NAME, y por un inhibidor de la citocromo P-450 monooxigenasa, que inicia la vía de formación de lipoxinoides a partir del ácido araquidónico. No queda aclarado cuál metabolito de esta vía sería responsable final del efecto vasodilatador. La ausencia de variación significativa sobre la vasodilatación, al bloquear la ciclooxigenasa con indometacina, sugiere

que la prostaciclina no sería un componente importante en el desarrollo de esta respuesta en los vasos mesentéricos.

En síntesis, estos resultados indican que la bradikina es capaz de actuar a nivel vascular, produciendo tanto relajación como contracción en el lecho arterial mesentérico precontraído con noradrenalina, en grado variable según la presión basal de perfusión y actuando a través de distintos mecanismos.

La vasoconstricción sería mediada por un metabolito del ácido araquidónico, posiblemente endoperóxido cíclico y/o tromboxano, mientras que la relajación tendría dos componentes principales, uno mediado por óxido nítrico y metabolitos derivados de la citocromo P-450 monooxigenasa y uno menor, mediado por prostanoïdes.

SUMMARY

PHARMACOLOGIC CHARACTERIZATION OF THE VASCULAR RESPONSE TO BRADYKININ IN RESISTANCE VESSELS

Background

Kinins are vasoactive hormones probably participating as a paracrine system in the local regulation of blood flow. Injected bradykinin has a biphasic action: vasodilation followed by vasoconstriction (Fasciolo & Nolly, 1990). The mechanisms probably involved in this response are analyzed in the present paper.

Method

Rats mesenteric artery was cannulated, perfused with saline (4 ml/min) and contracted with norepinephrine (10^{-5} M- 10^{-6} M). The response to agonists were measured as variations in perfusion pressure. When basal values were maintained between 30-60 mmHg, bradykinin produced a slight dilation followed by a great vasoconstriction. With a pressure between 70-100 mmHg, vasodilation was predominantly seen. L-NAME (10^{-4} M), a nitric oxide synthetase inhibitor and chlorotrimazol (10^{-8} M), a cytochrome p-45- inhibitor, significantly reduced ($p < 0.005$) the response to bradykinin. Indomethacin (1 µg/ml), a cyclooxygenase inhibitor, completely abolished the vasoconstrictive effect but only partially the vasodilation. Vasoconstriction induced by bradykinin was significantly reduced ($p < 0.001$) in the presence of SQ-29548, a PGH_2/TXA_2 receptor blocker.

Conclusions

The injection of bradykinin into mesenteric vessels produce vasodilation followed by vasoconstriction and the magnitude of the biphasic effect varies in relationship with the perfusion pressure. Relaxa-

tion has two main components (mediated by nitric oxide and cytochrome P-450) and one of lesser importance (mediated by prostanooids). It is possible that the vasoconstrictive response could be mediated by arachydonic acid metabolytes (probably cyclic endoperoxides and/or thromboxanes).

Key words Bradykinin - Mesenteric arteries - Indomethacin - L-Nitro Arginine - Chlorotrimazole

BIBLIOGRAFIA

1. Nolly HL, Scicli AG, Scicli G, Carretero OA. Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circ Res* 1985; 56: 816.
2. Saed GM, Carretero OA, Scicli AG. Kallikrein mRNA in the rat arteries and veins (abstract). *FASEB J* 1990; 4: A990.
3. Carretero OA, Scicli AG. Kinins paracrine hormone. *Kidney International* 1988; 34 (Suppl 26): S52-S59.
4. Regoli D. Neurohumoral regulation of precapillary vessels. The kallikrein-kinin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6 (Suppl 2): S401-S412.
5. Northover RM, Northover BJ. The effect of vasoactive substances on rat mesenteric blood vessels. *J Pathol* 1970; 101: 99-108.
6. Barabe J, Marceau F, Theriault B, Drouin JN, Regoli D. Cardiovascular actions of kinins in the rabbit. *Can J Physiol Pharmacol* 1979; 57: 78-91.
7. Fasciolo JC, Vargas LA, Lama MC, Nolly HL. Bradykinin induced vasoconstriction of the rat mesenteric vessels precontracted with noradrenaline. *Brit J Pharmacol* 1990; 101: 344-348.
8. Nolly HL, Miatello RM, Lama MC, Fasciolo JC. Endothelium and local control of vascular tone. *Biocell* 1993; 17 (2): 95-105.
9. Gimeno AL, Gimeno MA, Lazzari MA, Terragno AG, Terragno NA. Prostaglandinas y compuestos relacionados. Buenos Aires, El Ateneo, 1989.
10. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524.
11. McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol* 1965; 177: 21-30.
12. Dzau VJ. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 1986; 8: 553-559.
13. Campbell DJ. The site of angiotensin production. *J Hypertension* 1985; 3: 199-207.
14. Laragh JH, Sealey JE. The renin system and its pathophysiology in disease. *En: Seldin DW, Giebisch G (eds). The Regulation of Sodium and Chloride Balance.* New York, Raven Press, 1990; 195-234.
15. Miatello RM, González ES, Lama MC, Nolly HL. Effect of cicletanine on bradykinin-induced vasoconstriction in rat resistance vessels. *Hypertension* 1993; 21 (4): A303.