

## Capacidad moduladora del endotelio vascular: su modificación fisiológica y farmacológica.

JORGE A. NOWOGRODSKI, ALEJANDRO M. DOPICO, RODOLFO ROTHLIN,  
FRANCISCO J. E. STEFANO

Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Buenos Aires

Dirección para separatas: Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Junín 956, Piso 5º, (1113) Buenos Aires, Argentina

*Se analizó el papel del endotelio en las respuestas de la aorta torácica de rata al agonista alfa 1 fenilefrina y sus variaciones en función de la edad. En animales adultos la presencia de endotelio disminuyó tanto la respuesta máxima como la potencia de la fenilefrina. Al mes de edad el endotelio no modificó las respuestas máximas a fenilefrina aunque disminuyó la sensibilidad de las arterias por un factor de 3. El efecto depresor del endotelio sobre la edad y su magnitud en función de la edad describió una curva en campana, siendo el mínimo efecto a los 13 meses de edad. Por el contrario, el efecto sobre la potencia de fenilefrina no experimentó mayores cambios con la edad, manteniéndose la diferencia entre las arterias con y sin endotelio. Las diferencias observadas entre los animales más jóvenes y los adultos deben ser atribuidas a una menor liberación de factor relajante endotelial por el endotelio de las arterias de los animales más jóvenes, ya que la curva para el efecto relajante de la acetilcolina (endotelio dependiente) en estos animales se encontró desplazada hacia la derecha. Por el contrario, la relajación producida por nitroprusiato de sodio (endotelio independiente) no se modificó por la edad. Se propone, en base a los datos presentados, que la modulación de la respuesta arterial por el endotelio varía con la edad.*

Existen evidencias experimentales que indican que la relajación del músculo vascular se modifica con la edad. Es así que Fleish y colaboradores (1970) han demostrado en arteria de rata que la estimulación de los adrenoceptores beta-adrenérgicos induce menor relajación en animales viejos que en animales jóvenes. Estos resultados, que indican un deterioro en los mecanismos de relajación beta-dependientes, han sido confirmados posteriormente (Cohen y Berkowitz, 1974).

Recientemente se ha demostrado que a nivel de la pared arterial existen al menos dos mecanismos que conducen a la relajación del músculo liso: el dependiente del aumento del AMP cíclico intracelular y el dependiente del aumento intracelular de GMP cíclico. Los agonistas beta-adrenérgicos actuarían por el primer mecanismo, mientras que los vasodilatadores nitroderivados lo harían por el segundo (Rapoport y Murad, 1983). Además, a partir de los trabajos pioneros de Furchgott y Zawadzki (1980), se ha demostrado que una serie de sustancias vasodilatadoras, como la acetilcolina y la serotonina, ejercen su efecto de manera indirecta, liberando una sustancia de las células endoteliales que ha sido llamada "Factor Relajante Endotelial" (*Endothelium Derived Relaxing Factor, EDRF*). Este factor es liberado del endotelio vascular en respuesta a numerosos estímulos tales como: acetilcolina, serotonina, norepinefrina, etc. Es decir, los efectos vasodilatadores de estas sustancias se ven disminuidos o en algunos casos ausentes cuando se elimina mecánicamente la capa endotelial (Furchgott, 1984; Stefano y colaboradores, 1985). La liberación del EDRF depende de la integridad del sistema de la fosfolipasa A2 y se trataría de un radical libre derivado de ácidos grasos que, liberado al espacio intercelular, penetra a la célula muscular y produce la activación de la guanilatociclasa en una manera similar a los nitroderivados (Peach y colaboradores, 1985).

En vista del posible papel modulador que jugaría el endotelio en la contracción muscular, nos pareció de interés estudiar este sistema y sus variaciones con la edad de la rata.

### MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratas de origen Wistar. Los animales fueron muertos por dislocación cervical y se les extrajo un trozo de la aorta torácica que fue colo-

cado en solución de Krebs, limpiado de tejido adiposo y laxo perivascular y cortado en anillos de unos 2 mm de ancho. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente y la solución fue gaseada con mezcla de oxígeno 95%-anhídrico carbónico 5%. Se puso especial énfasis en evitar lesión del endotelio. La remoción del endotelio, cuando deseada, se logró mediante la introducción de una cánula rugosa de polietileno en la luz del anillo, la cual fue pasada varias veces por la luz arterial en estrecho contacto con la pared.

La integridad funcional del endotelio fue probada por la presencia o no de efecto relajante de la acetilcolina. Los anillos fueron suspendidos en un baño de órgano aislado de 10 ml conteniendo solución de Krebs a 37°C.

Por el interior de los anillos se pasaron dos alambres de acero, uno fijo al extremo inferior del baño y el otro suspendido de un transductor de fuerza isométrico FTO3. Las contracciones del músculo circular fueron registradas en un polígrafo Grass. Se realizaron curvas dosis-respuesta acumulativas a los agonistas, incrementando la concentración de los mismos en el baño en un factor de 3. La sensibilidad de la preparación a cada agonista se calculó como el logaritmo negativo de la concentración

molar del agonista que produce el 50% de respuesta ( $pD_2$ ).

Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se analizaron según el test "t" de Student.

## RESULTADOS

Las respuestas contráctiles al agonista alfa-adrenérgico fenilefrina en ratas adultas (2 meses de edad) difirieron según se tratase de anillos con endotelio intacto o no. En la Fig. 1 se muestra que cuando se había preservado el endotelio las respuestas máximas no superaron los 406 mg. En cambio, la remoción mecánica del endotelio aumentó la sensibilidad del tejido en forma marcada, aumentando no sólo la respuesta máxima del sistema en un factor de 3 veces sino que también incrementó la potencia del agonista ( $pD_2$  sin endotelio,  $7,57 \pm 0,18$ ;  $pD_2$  con endotelio,  $6,47 \pm 0,15$ ,  $p < 0,01$ ). En la Fig. 1 se muestra también que cuando los anillos con endotelio intacto son incubados con azul de metileno  $10 \mu M$  las respuestas a fenilefrina son semejantes a las que se obtienen cuando se remueve el endotelio mecánicamente.

La Fig. 2 muestra las respuestas máximas de anillos de aorta con y sin endotelio a diferentes edades.

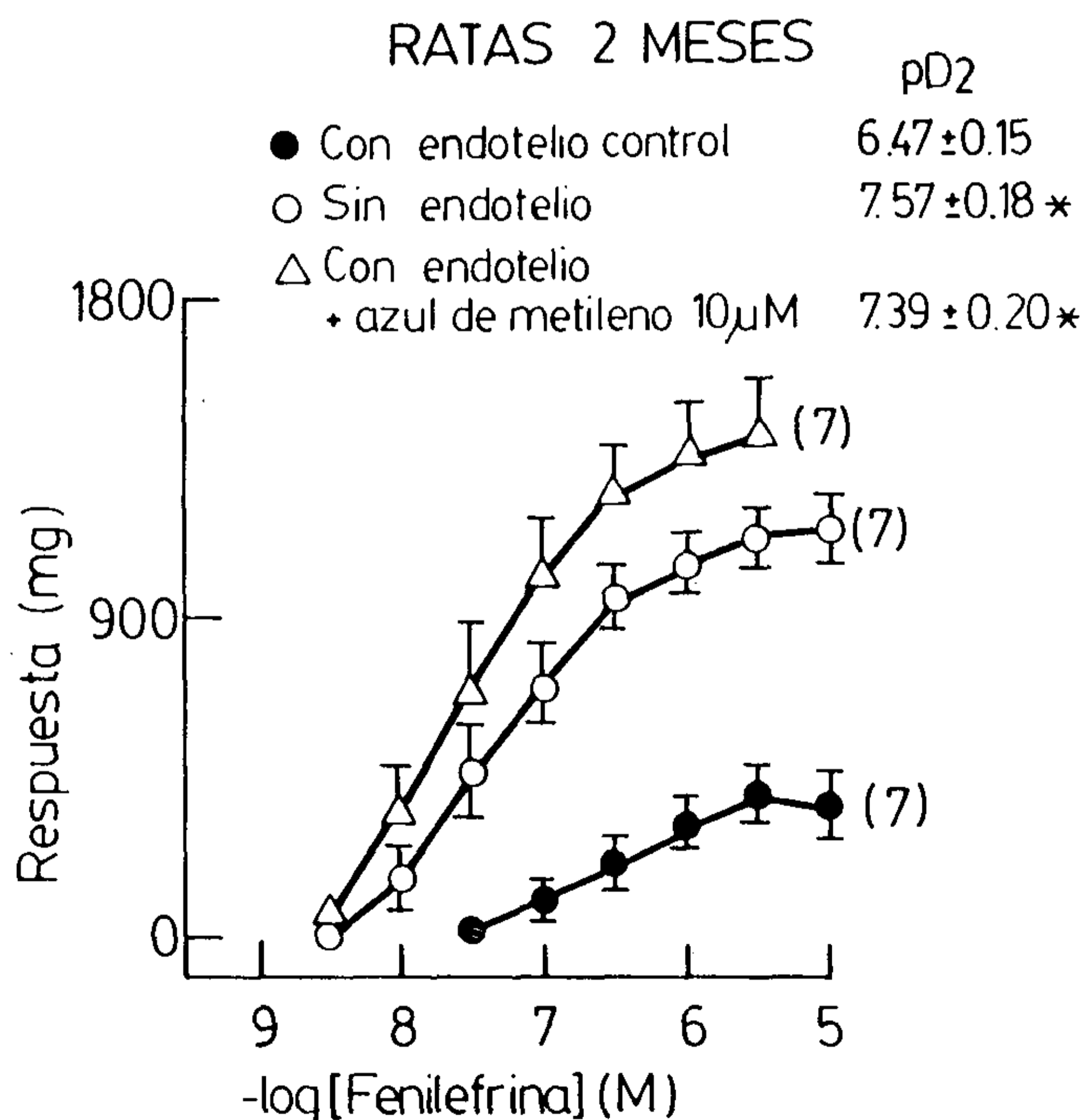


Fig. 1. Efecto del azul de metileno  $10 \mu M$  (triángulos) y de la eliminación mecánica del endotelio (círculos abiertos) sobre las respuestas a la fenilefrina en aorta torácica de rata. Las curvas se realizaron sobre anillos independientes. El azul de metileno se agregó 10 minutos antes de la curva de fenilefrina. Se presentan las medias  $\pm$  SEM; entre paréntesis, número de experimentos, \*  $p < 0,01$ , comparado con la arteria con endotelio control.

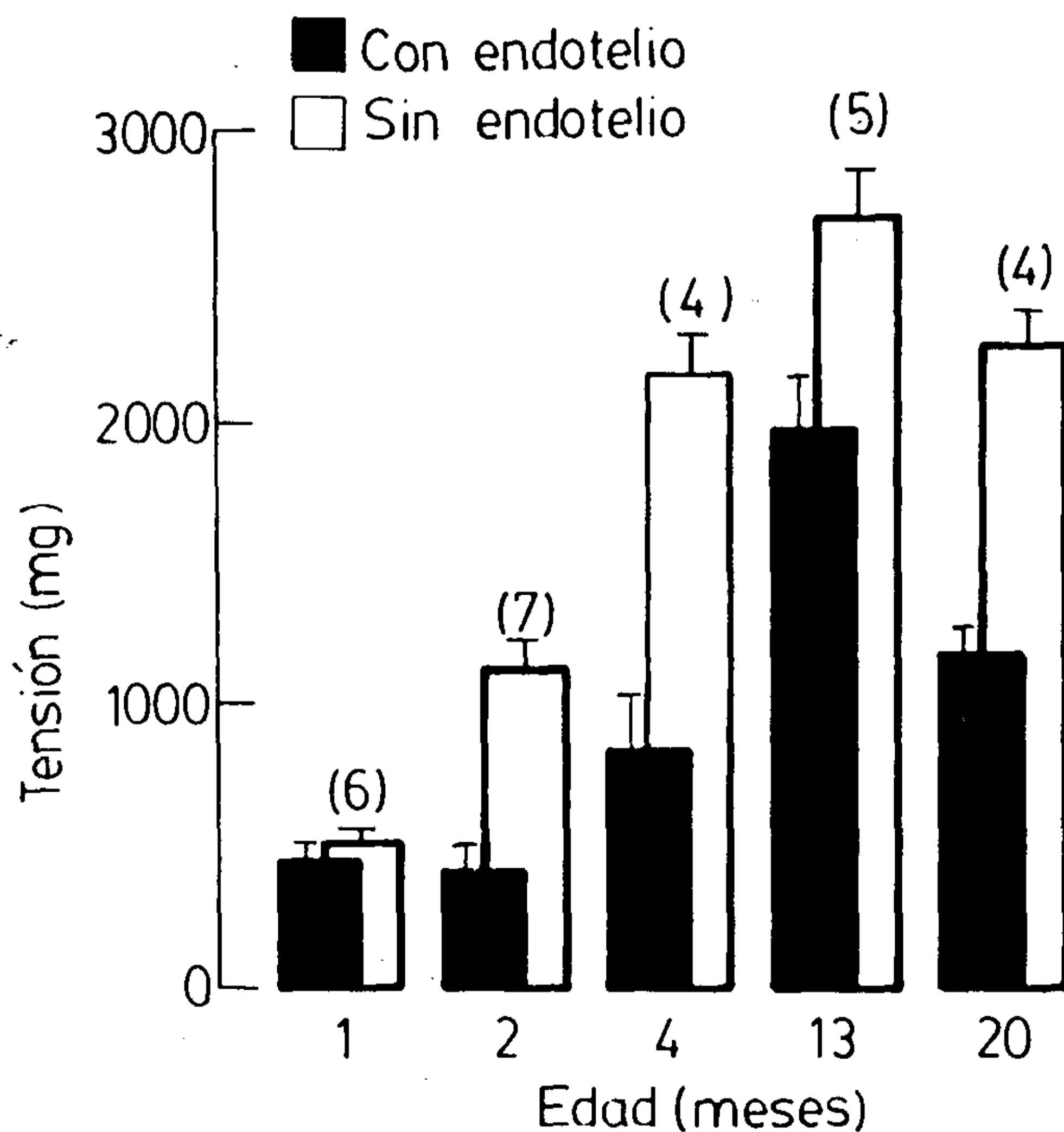


Fig. 2. Variación de las respuestas máximas a la fenilefrina con la edad. Se presentan las respuestas máximas en Mg obtenidas en curvas dosis-respuesta completas en anillos de aorta torácica con endotelio intacto (barras rayadas) y con endotelio removido (barras vacías). Entre paréntesis, número de experimentos. \*  $p < 0,05$  comparado con las arterias con endotelio.

des. Como se puede apreciar, el desarrollo de máxima tensión en respuesta a fenilefrina se incrementa con la edad. En las arterias con endotelio intacto las respuestas máximas no varían demasiado hasta los 4 meses. Luego entre este tiempo y los 13 meses hay un brusco incremento de la actividad contráctil, volviendo a descender hacia los 20 meses. El patrón de incremento en los anillos sin endotelio es diferente. En el período que va entre un mes y dos meses de edad la respuesta se duplica, apreciándose un importante incremento hasta los 4 meses de edad. Desde este tiempo en adelante la magnitud de respuesta máxima no cambia de manera importante.

En cuanto a la potencia de fenilefrina en los distintos tiempos estudiados, se puede apreciar (Tabla 1) que no experimenta cambios marcados entre los 2 y los 20 meses de edad. Sin embargo, luego de los 30 días de vida hay una marcada disminución en la sensibilidad a la fenilefrina.

Para estudiar si las diferencias encontradas en función de la edad eran debidas a una diferente participación de los mecanismos endoteliales en las respuestas a la fenilefrina, se analizó la eficacia relajante de anillos de aorta con endotelio intacto y precontraídos por fenilefrina. Para producir relajación se utilizaron dos fármacos con mecanismos de acción diferente: acetilcolina, que actúa sobre el endotelio produciendo la liberación de EDRF, y nitroprusiato de sodio, que actúa directamente sobre el músculo liso. En la Fig. 3 se muestra el efecto relajante de concentraciones crecientes de acetilcolina sobre anillos expuestos a concentraciones máximas de fenilefrina. Se aprecia claramente que la potencia de acetilcolina fue 10 veces mayor en anillos de aorta de animales de 20 meses que en ratas de un mes de edad. Sin embargo, en ambos grupos la acetilcolina produjo la relajación total del sistema. En cambio, la potencia del nitroprusiato, así como su efecto máximo, fueron similares en ambos grupos experimentales (Fig. 4).

Tabla 1  
Potencia de fenilefrina en diferentes edades

Edad	Con endotelio pD2	Sin endotelio pD2
1 mes	7,69 ± 0,03	8,20 ± 0,02*
2 meses	6,47 ± 0,15	7,39 ± 0,20*
4 meses	6,79 ± 0,07	7,57 ± 0,13*
13 meses	6,88 ± 0,07	7,41 ± 0,05*
20 meses	6,50 ± 0,11	7,26 ± 0,08*

PD2 = log negativo de la concentración molar del agonista que produce respuesta 50% del máximo. \* Indica diferencias entre las preparaciones con y sin endotelio con  $p < 0,05$ .

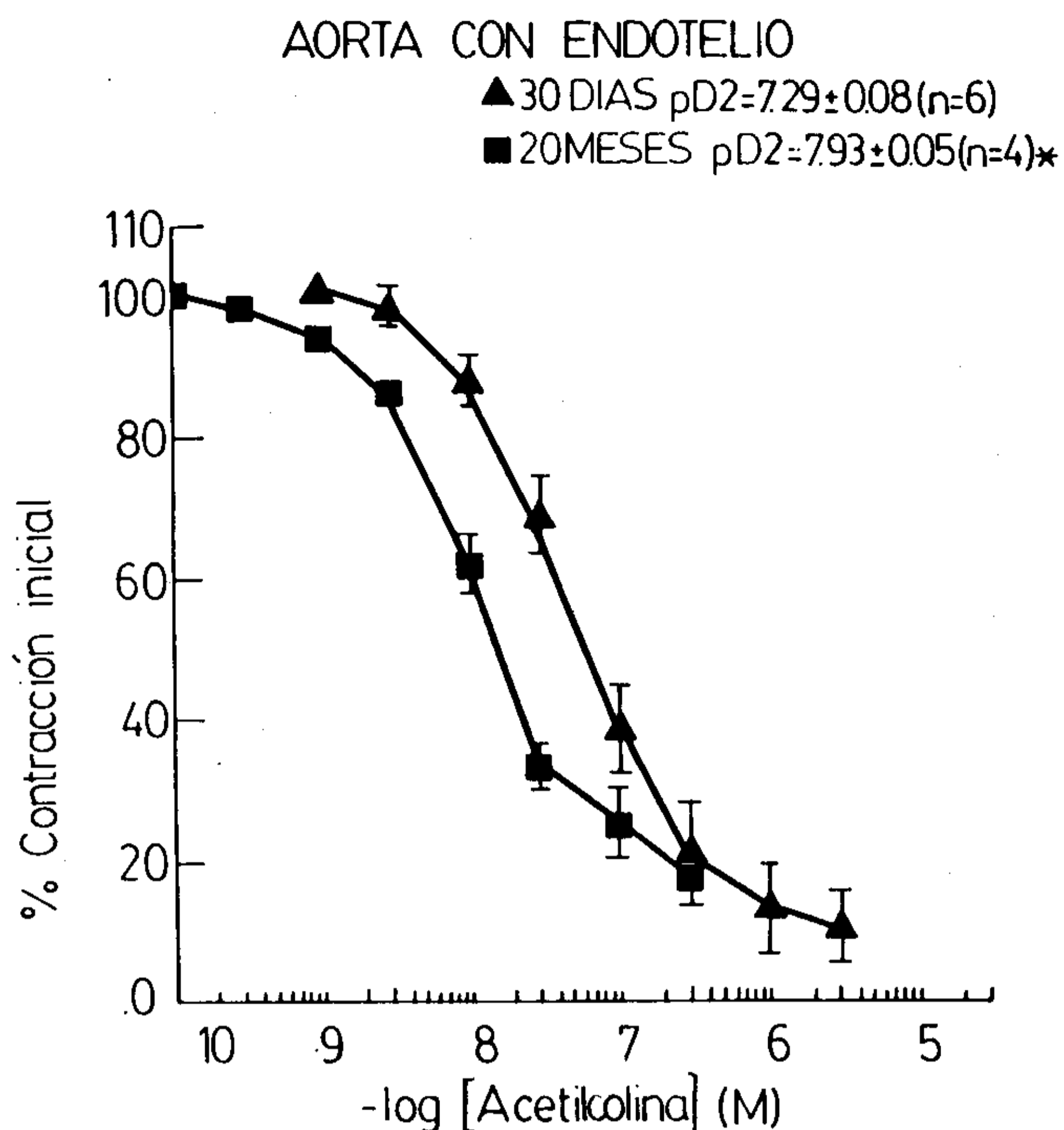


Fig. 3. Efecto de la edad sobre las curvas dosis-respuesta a la acetilcolina en aorta torácica de rata, con endotelio. Las arterias se precontrañeron hasta su respuesta máxima con fenilefrina (10  $\mu$ M). Entre paréntesis se indica el número de experimentos. \*  $p < 0,001$ .

## DISCUSION

Los resultados presentados confirman la variación de la respuesta contráctil del tejido arterial en función de la edad, hecho que ha sido referido con anterioridad por diversos autores (Cohen y Berkowitz, 1974; Fleish y Hooker, 1976). Sin embargo, en estos trabajos no se tuvo en cuenta el papel desempeñado por el endotelio. Nuestros resultados demuestran además que en la respuesta a un agonista selectivo de receptores alfa 1, como la fenilefrina, existen dos componentes: un efecto estimulador directo sobre el músculo liso y un efecto antagónico que resulta de la interacción de fenilefrina con el endotelio intacto. Es muy probable que este efecto relajador esté relacionado con la liberación del factor endotelial descrito por Furchgott y Zawadzki (1980) y no por prostaciclina, ya que no fue modificado por el agregado de 10  $\mu$ M indometacina (resultados no mostrados). El efecto del endotelio no es debido a un fenómeno de barrera ni de captación de fármacos, dado que el azul de metileno, efectivo atrapante de radicales libres e inhibidor de la guapilatociclasa, antagonizó el efecto inhibitor del endotelio (Rapoport y Murad, 1983). Por lo tanto, podemos inferir que

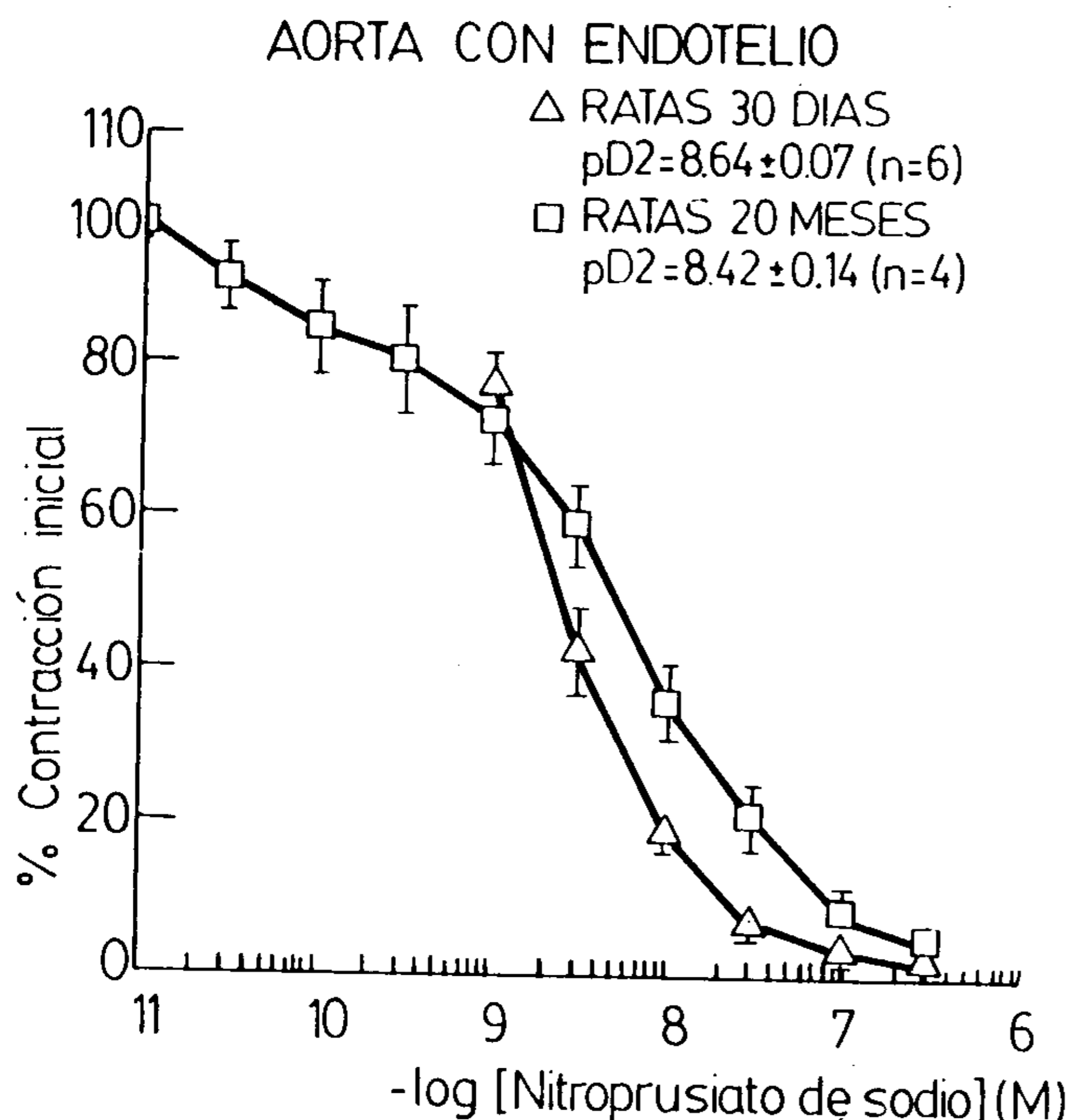


Fig. 4. Efecto de la edad sobre las curvas dosis-respuesta al nitroprusiato de sodio en aorta torácica de rata, con endotelio. Las arterias se precontrajeron hasta su contracción máxima con fenilefrina ( $10 \mu M$ ). Entre paréntesis, número de experimentos.

para una concentración dada de fenilefrina, la diferencia entre las respuestas de los anillos con endotelio y las de los anillos sin endotelio representa una estimación de la actividad relajante del endotelio. En base a esta hipótesis podemos afirmar que la actividad endotelial varía con la edad del individuo. Es muy escasa a edad temprana (1 mes) y a lo largo del desarrollo va adquiriendo mayor importancia.

El estudio de la actividad relajante de la acetilcolina también indica diferencias en el mecanismo de relajación mediado por el endotelio. Así, en animales de 20 meses de edad la potencia de acetilcolina fue mayor que en los tejidos de animales de 30 días. Esta diferencia no sería debida a una mayor actividad de los mecanismos intracelulares que median la relajación del músculo liso, ya que la potencia del nitroprusiato que activa directamente la guanilatociclasa (Rapoport y Murad, 1983) fue similar en ambas edades.

Nuestros resultados demuestran que la modulación de la respuesta arterial varía con la edad y que al incremento de la actividad contráctil con la edad se desarrolla, en paralelo, una mayor capacidad compensatoria del endotelio, tendiéndose de esta manera al equilibrio en las respuestas.

## SUMMARY

The role of endothelium in the responses of rat thoracic aorta to phenylephrine (PHE), an  $\alpha_1$  agonist, and its variations with age were investigated. Both the potency and the maximal response to PHE were diminished in the presence of endothelium in adult rats. In 1 month old rats the endothelium did not change the maximal response to PHE although it decreased 3-fold the sensitivity of the arteries. A powerful depressant action of endothelium upon maximal responses could be seen in 2 month old rats. This depressant effect decreased with age being the lowest in 13-month old rats. On the other hand, the potency of PHE did not change with age and the difference between arteries with and without endothelium was maintained. A lower release of endothelium derived relaxing factor by younger animals may explain the differences found between these animals and the older ones. This hypothesis is supported by the fact that the dose-response curve of relaxant effect of acetylcholine (endothelium-dependent relaxation) was shifted to the right in the younger animals. By contrast, the relaxant effect of sodium nitroprusside (endothelium-independent relaxation) was unchanged by aging. In conclusion, our results suggest that the arterial responses are modulated by the presence of endothelium and this modulation changes with the age of the animals.

## BIBLIOGRAFIA

- Cohen ML, Berkowitz BA: Age-related changes in vascular responsiveness to cyclic nucleotides and contractile agonists. *J Pharmacol Expt Ther* 191: 147-155, 1974.
- Fleish JH, Hooker CS: The relationship between age and relaxation of vascular smooth muscle in the rabbit and rat. *Circulation Res* 38: 243-249, 1976.
- Fleish JH, Maling HM, Brodie BB: Beta receptor activity in rat aorta variation with age and species. *Circulation Res* 26: 151-162, 1970.
- Furchgott RF: The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 24: 175-197, 1984.
- Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- Peach MJ, Singer HA, Loeb AL: Mechanism of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochemical Pharmacology* 34: 1867-1874, 1985.
- Rapoport RM, Murad F: Endothelium-dependent and nitrovasodilators-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic AMP. *J Cyclic Nucl Prot Phosph Research* 9: 281-296, 1983.
- Stéfano FJE, Dopico AM, Nowogrodski JA, Rothlin RP: Farmacología de la serotonina y función vascular. *Medicina* 45: 437-442, 1985.