

Un factor liberado por la distensión de la aurícula de rata *in vitro* antagoniza el efecto constrictor de la norepinefrina en vaso aislado

Drs. Roberto Correa, Alejandro Illanes

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina Universidad de Oriente-Bolívar.

RESUMEN

Estudiamos el efecto un principio activo auricular producto de la distensión controlada de aurículas de rata sobre los efectos de la norepinefrina y determinamos la participación endotelial del vaso aislado sobre tal efecto relajante. Para ello, se disecó la aorta torácica de rata en solución Krebs-Henseleit modificada, a pH 7,4, burbujeada con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂ a temperatura constante de 37°C. Se obtuvieron manguitos de 5 mm de longitud, se montaron en baño de órgano aislado y se ensayaron curvas de dosis crecientes y acumulativas de norepinefrina antes y después de incubarlos con factor vasorrelajador liberado por la aurícula, tanto en manguitos con endotelio vascular y sin éste. Encontramos que el factor vasorrelajador liberado por la aurícula, disminuye significativamente la respuesta vasoconstrictora de la norepinefrina después de incubar con el factor vasorrelajador liberado por la aurícula. En conclusión, el factor vasorrelajador liberado por la aurícula obtenido y ensayado por nosotros, no requiere del endotelio vascular para producir disminución significativa de los efectos vasoconstrictores de la norepinefrina.

Palabras clave: Aorta-torácica. Rata. Endotelio. Norepinefrina. Acetilcolina. Factor natriurético auricular. Factor vasorrelajante liberado por la aurícula.

SUMMARY

The effect of an active substance produced by the controlled rat atrium distension on the effects of norepinephrine, and the endothelial isolated vessel participation on that relaxin effect were studied. Dissected rat thoracic aorta was placed in a modified Krebs-Henseleit solution, pH 7.4, gased with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at constant temperature of 37°C. Rings of 5 mm were obtained, and placed in an isolated organ bath, and increasing doses of norepinephrine were assessed before and after incubation with vasorelaxin factor released by the atrium, both rings with or without vascular endothelium. The substance, significantly decreased the vasoconstrictor response to norepinephrine after incubation with this factor. In conclusion, the vasorelaxin factor released by the atrium does not require the vascular endothelium in order to produce significant decrease of the norepinephrine vasoconstriction effects.

Key words: Thoracic aorta. Rat. Endothelium. Norepinephrine. Acetylcholine. Atrium natriuretic factor. Vasorelaxin factor released by the atrium.

INTRODUCCIÓN

En los inicios de la década de los 80, se citan dos hallazgos de gran trascendencia para la investigación cardio-reno-vascular experimental y clínica moderna: el rol del endotelio como relajador del tono vascular y la existencia de un factor natriurético sintetizado y liberado por el músculo auricular (1,2).

Según De Bold y col., previo a los años 80, se describen morfológica e histoquímicamente en el atrio, gránulos parecidos a los presentes en las células que producen hormonas polipeptídicas y que son alterados por los cambios de volumen y por el balance electrolítico (1).

En 1981 De Bold y col., obtienen un extracto crudo, homogeneizado, del miocardio auricular de rata, lo administran en especímetros homólogos *in vivo*, y obtienen disminución de la presión sanguínea, aumento del volumen urinario y del sodio excretado. Describen entonces el denominado factor natriurético auricular (FNA). Según Cantin y Genest, este factor resultó ser un péptido el cual fue aislado y purificado en 1983 y que en ese mismo año se logra su síntesis química en el laboratorio (1,3).

Jellife en 1962, da a conocer el efecto relajador producido por la acetilcolina en tiras aisladas de aorta de conejo precontraídas con norepinefrina o epinefrina, desconociéndose el mecanismo por el cual esto sucedía (4).

En 1966, Lord Adrián Florey (citado por Lerman y Burnett (5)), considera el revestimiento endotelial como una barrera de protección de la pared vascular y propone la analogía de un papel de celofán que recubriría la cara interna del árbol vascular. No es sino en 1980 cuando Furchgott y Zawadzki (2), dan a conocer sus hallazgos sobre la obligatoriedad de la presencia del endotelio para que se produzca el efecto relajador de la acetilcolina en tiras aisladas de aorta torácica de conejo precontraídas con un adrenérgico. Desde entonces se conoce el rol del endotelio en la acción relajante de muchas sustancias y drogas. A su vez, mediante una técnica ingeniosa, tales autores descubren que el mecanismo responsable de la relajación es indirecto, es decir, a través de un elemento que ellos llamaron factor relajante derivado del endotelio (FRDE), que se difunde desde el endotelio hasta el músculo liso subyacente para producir su efecto relajante. Además, demostraron morfológicamente que la presencia del endotelio en las arterias aisladas está directamente vinculada con la relación vascular. El receptor de las células

endoteliales, al cual se une la acetilcolina para producir relajación del músculo liso arterial, es muscarínico (2,5,6).

Existen, además de la acetilcolina, otras sustancias que necesitan del endotelio para producir relajación de los vasos, tales como bradiquinina, sustancia P, histamina, serotonina, ácido araquidónico. Por otro lado, la remoción de la estructura endotelial no interfiere en la acción relajante de otras drogas entre las cuales destacan, isoproterenol, nitrito de sodio, nitroprusiato de sodio, papaverina, prostaglandinas (PGE₂ y PGI₂) (6).

Por muchos años, el interés acerca de la naturaleza del FRDE atrajo la atención de los investigadores, desde que Furchgott y Zawadzki (2) lo señalaron en 1980, hasta que Palmer y col. (7) plantean su identidad química y farmacológica a partir de las células endoteliales cultivadas, correspondiéndose éste con el óxido nítrico (ON). En este mismo período, Ignarro y col. (8), fundamentan tal hallazgo. No obstante Myers y col. (9), postulan que el FRDE se correspondería más bien con un nitrosol como la S-nitrosocisteína en vez del ON.

El óxido nítrico derivado del endotelio es sintetizado a partir de L-arginina endógena por un proceso enzimático que puede ser inhibido por análogos estructurales de la arginina. Es un gas con un número impar de electrones, lo que se define como un radical libre (8).

El endotelio regula el tono del músculo liso vascular, tanto en vasos de conducción como en vasos de resistencia que son más pequeños. Algunos de los factores paracrinos que pueden modular el tono vascular incluyen las prostaciclina y factores relajantes no prostanoides y, también, diferentes factores vasoconstrictores incluyendo la familia de las endotelinas (10).

El endotelio vascular es un órgano blanco en el que patologías comunes como la aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes e hipertensión arterial, producen deterioro importante que afectan la relación vascular dependiente del endotelio (5,10,11).

El efecto vascular del factor natriurético auricular (FNA), ya sea como péptido sintético o como productos purificados de extractos atriales, ha sido ampliamente ensayado en arterias *in vitro*. En 1983, Currie y col. (12), ensayan un homogeneizado de aurícula de rata sobre espirales de aorta de conejo precontraídas con infusión continua de norepinefrina

y encontraron un efecto vasorrelajador sobre estas preparaciones. La separación de los componentes activos a través de columna cromatográfica reveló la presencia de por lo menos dos principios con actividad vasorrelajante. Winquist y col. (13), al ensayar FNA sintético de 26 aminoácidos sobre manguitos aislados de aorta torácica de conejo, precontraídos con serotonina, encontraron relajación marcada tanto en manguitos con endotelio vascular como en los que se les destruyó mecánicamente el mismo. Según Cantin y Genest (3), el FNA sintético inhibe tanto la actividad vasoconstrictora de la angiotensina II como de la norepinefrina, persistiendo el efecto vasorrelajador en vasos sanguíneos sin endotelio; lo cual indica que el FNA actúa sobre las células musculares lisas de los vasos.

Currie y col. (14) en 1984, a partir de un extracto auricular de rata, mediante técnicas de purificación de péptidos, obtienen un precursor polipeptídico llamado atriopeptinógeno, del cual derivaron a su vez dos péptidos o atriopeptinas I y II, con 21 y 23 aminoácidos, respectivamente. La atriopeptina I produjo relajación del músculo liso intestinal, pero no del músculo liso vascular. En cambio, la atriopeptina II produjo relajación en ambos tipos de músculos lisos.

El mecanismo a través del cual el FNA produce relajación vascular es aumentando la actividad de la guanilato ciclasa particulada y por consiguiente del guanosinmonofosfato cíclico (GMP_c) tisular (13).

El FNA es sintetizado en una forma pre-pro hormona peptídica que contiene 152 aminoácidos en la rata y 151 aminoácidos en el humano. Existe un alto grado de homología entre las secuencias de aminoácidos de la hormona humana y la de rata, sólo difiere en un aminoácido (15).

Según De Bold, la principal forma de FNA en el homogeneizado auricular de rata y gránulos aislados, es un péptido de 126 aminoácidos, la forma circulante un péptido de 28 aminoácidos derivado de un pre-pro FNA de 123 a 150 aminoácidos. Este péptido de 28 aminoácidos es también la principal forma detectada en perfusados de aurículas aisladas; de modo que es probable que el péptido de 126 aminoácidos sea procesado al péptido de 28 aminoácidos antes de su liberación de los cardiocitos (15).

Recientemente, Illanes y col. (16) en 1993, dan a conocer la existencia de un principio activo liberado por distensión controlada de las aurículas de rata *in vitro*. El mismo relaja manguitos aislados de aorta torácica de rata *in vitro* precontraídos con fenilefrina

y, a su vez, disminuye la respuesta vasoconstrictora a esta droga cuando los manguitos han sido incubados previamente con el principio activo. Aunque los autores desconocen la naturaleza química del principio obtenido, es razonable pensar que el mismo podría corresponderse con el FNA.

En el presente trabajo, se estudia la influencia del principio activo o factor vasorrelajador liberado por la aurícula (FVLA) sobre los efectos vasoconstrictores de la norepinefrina. En vista de que se ha descrito que péptidos atriales sintéticos y semi-sintéticos producen relajación vascular, aun en ausencia de endotelio de arterias aisladas, dilucidamos si la integridad funcional del endotelio en la preparación de aorta aislada es necesaria para que el FVLA ejerza su acción vasodilatadora.

MÉTODOS

Extracción del factor vasorrelajador liberado por la aurícula (FVLA)

Para obtener el principio activo (FVLA) de las aurículas de rata, se procedió de acuerdo con la técnica descrita por Illanes y col. (16). Rápida y cuidadosamente, se extrajeron y disecaron, sucesivamente, dos aurículas de ratas Wistar, con un mínimo de tracción o estiramiento en una cápsula de órgano aislado con solución Krebs-Henseleit (KH) modificada con la siguiente composición milimolar (mM): NaCl 122,00; KCl 4,87; KH₂PO₄ 1,2; MgCl₂ x 6H₂O 1,2; Glucosa x H₂O 11,5; CaCl₂ x 2H₂O 2,00; NaHCO₃ 15,00; EDTA 0,026 a ± 10°C que contenía además 1 mg/l de lisinopril, un inhibidor enzimático. Las ratas se mataron con un golpe contundente en la cabeza y se les separó la cabeza con una guillotina. El peso de las ratas fue 295 ± 69 g.

Durante la disección, la solución se burbujeaba con una mezcla gaseosa de O₂, 95% y CO₂ 5%. En un lapso no mayor de 30 minutos, con hilo de seda se anudó cada aurícula por ambos extremos, uniéndose luego un extremo al fondo del baño de órgano aislado y el otro a su respectivo transductor de fuerza Grass FTO3. Estos, a su vez, estaban conectados a un fisiógrafo Grass modelo 7E, que fue rigurosamente equilibrado y calibrado con una pesa de un gramo para obtener posteriormente el registro y medir las contracciones espontáneas de las aurículas y las tensiones basales y diastólicas controladas a las que fueron sometidas.

Una vez que se colocaron las dos aurículas en el

baño de órgano aislado, se procedió a agregar 5 ml de solución KH con pH 7,4 y se controló, en esta situación, la temperatura permanentemente a $31 \pm 1^\circ\text{C}$; a continuación las aurículas se sometieron a la tensión basal de 0,5 g, desplazando el transductor mediante un tornillo micrométrico hasta alcanzar la carga deseada. Después de haber estabilizado las aurículas y registrado sus contracciones espontáneas por un lapso de 1 hora, se procedió a aplicar tensiones crecientes y progresivas a cada preparación de 1,5, 3 y 4,5 g, sucesivamente, dejando un intervalo de 20 minutos entre cada aplicación. Después de la tensión máxima se procedió a tomar la muestra, la cual se acidificó a pH aproximadamente de 5 con una solución de ácido acético un molar (M), se liofilizó, se selló en frasco estéril y almacenó a una temperatura de -15°C .

Días después se reconstituyó con agua destilada y se ensayó sobre manguitos aislados de aorta torácica de la misma especie.

Ensayo del principio activo (FVLA) sobre manguitos aislados de aorta torácica

Con el propósito de estudiar el efecto del perfusado auricular obtenido por nosotros en el laboratorio, como se mostró anteriormente, la aorta torácica de rata Wistar de 295 ± 52 g, fue cuidadosamente disecada en una cápsula de órgano aislado con solución KH a pH 7,4 y a temperatura ambiente, como lo describe Illanes y col. (16). Las ratas se mataron con un golpe contundente en la cabeza, se les separó la misma con una guillotina y se exanguinaron. Se abrió el tórax y se extrajo la aorta torácica. Mientras se practicaba la disección del vaso, la solución se burbujeaba con una mezcla de O_2 , 95% y CO_2 , 5%. Una vez que éste quedaba libre de grasa perivascular, se seleccionaba y seccionaba un manguito de aorta torácica de aproximadamente 5 mm de longitud.

Dependiendo del protocolo de experimentación se conservaba el endotelio vascular o se le extraía mecánicamente; para esto, se introducía una pinza curva de uso oftalmológico en la luz del manguito haciéndolo rodar y presionándolo suavemente sobre el papel de filtro de 3 a 4 veces, siguiendo la técnica de Furchgott y Zawadzki (2), y de Carrier y col. (17). El manguito se montaba en ganchitos con forma de estribo y se instalaba en un baño de órgano aislado con solución KH, pH 7,4 y a temperatura constante de 37°C , burbujeada con la mezcla gaseosa ya mencionada.

Se registraron los cambios de tono mediante un transductor de fuerza Grass FTO3 y un fisiógrafo Grass modelo 7E. Después de 1 hora de estabilización en solución KH con una tensión basal de 1,5 g, que se ajustaba a su valor inicial cada 15 minutos y se le hacía un recambio de KH para prevenir la acumulación de metabolitos, la solución que bañaba la preparación se cambiaba a solución despolarizante isoosmótica con KCl 70 mM, todo siguiendo la técnica de Vinet y col. 1991 (18). Con esto se obtenía la contracción isométrica máxima (100%) desarrollada por el manguito. A continuación se sometía la preparación a la prueba de la acetilcolina. Para ello, se contraía el manguito con una concentración de 10^{-6} M de norepinefrina (NE) y cuando se alcanzaba la contracción máxima, lo que ocurría en un tiempo menor de 5 minutos, se le agregaba al baño 1 ml de solución de acetilcolina 10^{-3} M.

Si la preparación se relajaba rápidamente nos indicaba que conservaba su endotelio funcional, y en caso contrario lo había perdido: prueba de Furchgott y Zawadzki (2). Como no se ha definido un patrón cuantitativo en relación con la aceptación de la presencia o no de endotelio funcional, con base en nuestra experiencia introdujimos el siguiente criterio:

- a. Relajación $\geq 12\%$, producida por acetilcolina: endotelio funcional presente.
- b. Relajación $< 12\%$, carencia de respuesta relajadora o respuesta vasoconstrictora a la acetilcolina: endotelio funcional ausente.

Luego de realizada la prueba con acetilcolina se lavó la preparación tres veces con solución KH a intervalos de 3 minutos entre cada lavado, se comenzó el ensayo en diferentes grupos experimentales y control que se definen a continuación.

Grupos experimentales

A. Grupo experimental: norepinefrina (NE) + lavado + FVLA + NE, en manguito con endotelio.

Este serie experimental consistió en lo siguiente:

1. Ensayo de dosis crecientes y acumulativas de NE y posterior lavado con solución KH.
2. Incubación en 1 ml de FVLA reconstituido, durante 15 minutos y sin lavar la preparación se procedió a,
3. Ensayo de una segunda curva de concentraciones crecientes y acumulativas de NE.

Se comenzó el ensayo de 5 dosis crecientes y acumulativas de NE; desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M, dejando un intervalo entre cada dosis de 3 a 5 minutos, durante el cual se alcanzó el efecto máximo. Posteriormente se realizaron 5 lavados de la preparación con KH, con intervalos de 3 minutos entre cada lavado. Luego se incubó con 1 ml reconstituido del perfusado auricular (FVLA), obtenido como se describió anteriormente, durante 15 minutos. A continuación, sin lavado previo, se ensayaron otra vez las 5 dosis crecientes y acumulativas de NE, como se describió antes. Seguidamente se ensayó de nuevo acetilcolina 10^{-3} M. Esto se evidenció a través de la relajación del manguito según el criterio descrito. Posteriormente, se lavó la preparación con KH y se realizó la prueba con solución despolarizante KCl 70 mM para registrar nuevamente la contracción isométrica máxima y con ello se comprobó al final del experimento, la integridad funcional de la preparación.

B. Grupo experimental: NE + lavado + FVLA - NE, en manguito sin endotelio.

Esta serie experimental consistió en lo siguiente:

1. Ensayo de dosis creciente y acumulativa de NE y posterior lavado con solución KH,
2. Incubación con 1 ml de FVLA reconstituido, durante 15 minutos, sin lavar la preparación y luego,
3. Ensayo de una segunda curva de concentraciones crecientes y acumulativas de NE.

Se procedió igual a lo referido en (A), excepto que en este caso se comprobó a través de la prueba de la acetilcolina 10^{-3} M, al inicio y a final, la ausencia del endotelio vascular funcional, según el criterio ya establecido.

C. Grupo control: NE + lavado + vehículo + NE, en manguitos aislados de aorta de rata.

Esta serie experimental consistió en lo siguiente:

1. Ensayo de curva acumulativa dosis-efecto norepinefrina y posterior lavado con solución KH.
2. Incubación de 1 ml de vehículo reconstituido, durante 15 minutos, sin lavar la preparación.
3. Ensayo de una segunda curva de dosis-efecto de norepinefrina.

Se procedió de igual forma que con los grupos experimentales (A y B), excepto que en este caso, en vez de añadir 1 ml de FVLA reconstituido, se

administró igual volumen de solución KH reconstituido (vehículo) el cual se mantuvo en las mismas condiciones de almacenamiento que las muestras, en este caso sin haber estado en contacto con el músculo auricular (FVLA).

Esta prueba control se practicó tanto en manguitos con endotelio como en aquellos en los cuales la prueba de Furchgott y Zawadzki fue negativa. Como entre ambos grupos no hubo diferencia, los resultados se presentan acumulados (n= 10).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan en porcentaje de tensión desarrollada por los manguitos de aorta, tomando como patrón de comparación el porcentaje máximo de 100% desarrollado por el manguito en presencia de solución despolarizante KH-KCl 70 mM. La dosis de norepinefrina se expresan como el logaritmo negativo de la concentración molar (-Log M). Los valores se presentan en promedio como medida de tendencia central y su dispersión en \pm error estándar de la media (\pm EEM). Para los grupos experimentales en los que se ensayó el FVLA en manguitos de aorta torácica con endotelio y sin endotelio, así como en el grupo control en el que se ensayó el vehículo mantenido en iguales condiciones de almacenamiento que la solución con FVLA, se usó test t de Student sobre datos pareados para medir a nivel de significación estadística. El nivel de significación para descartar la hipótesis nula fue $P < 0,05$ (19,20).

RESULTADOS

En la Figura 1 se observa que el aumento de tensión desarrollado por la acción de la norepinefrina en manguitos con endotelio luego de incubarlos con FVLA, disminuye significativamente ($P < 0,005$) para las concentraciones de NE 10^{-6} M hasta 10^{-4} M, en comparación con el aumento de tensión por NE antes de la incubación con los manguitos con el FVLA .

En la Figura 2, se muestra que el aumento de tensión desarrollado por la acción de la NE en manguitos de aorta sin endotelio, luego de incubarlos con FVLA, es significativamente menor ($P < 0,05$) para las concentraciones de NE 10^{-6} M hasta 10^{-4} M, en comparación con el aumento de tensión por NE antes de la incubación de los manguitos con el FVLA.

EFFECTO CONSTRICCTOR DE LA NE

Efecto del FVLA sobre la respuesta a la noradrenalina de manguitos aislados de aorta torácica de rata con endotelio

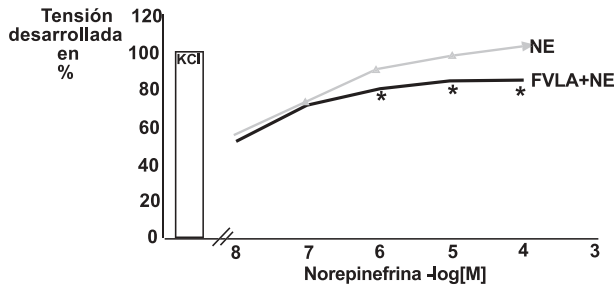


Figura 1. Curva de dosis-respuesta de norepinefrina en manguitos aislados de aorta torácica de rata con endotelio antes (NE) y después de incubar la preparación con factor vasorrelajador liberado por la aurícula de rata (FVLA + NE). La tensión desarrollada por cada dosis acumulativa se expresa como el porcentaje de respuesta contráctil máxima producida por una solución despolarizante con KCL 70 mM, en cada manguito; siendo la tensión máxima desarrollada por la acción despolarizante: $1,89 \pm 0,96$ g (n= 8). Las dosis se expresan como el logaritmo negativo de la concentración molar. Los valores son el promedio de n= 8 para NE para todas las dosis excepto -Log 8 n= 4; * (P< 0,005).

n= número de experimentos.

Efecto del FVLA sobre la respuesta a la noradrenalina de manguitos aislados de aorta torácica de rata sin endotelio

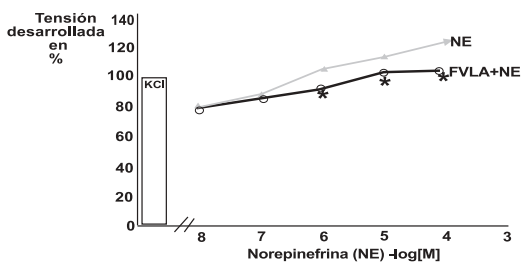


Figura 2. Curva de dosis-respuesta de norepinefrina en manguitos aislados de aorta torácica de rata sin endotelio antes (NE) y después de incubar factor vasorrelajador liberado por la aurícula (FVLA + NE). La tensión desarrollada por cada dosis acumulativa se expresa como el porcentaje de respuesta contráctil máxima producida por una solución despolarizante con KCL 70 mM, en cada

manguito; siendo desarrollada por la acción despolarizante: $1,68 \pm 0,70$ g (n= 7). Las dosis se expresan como el logaritmo negativo de la concentración molar. Los valores son el promedio de n= 8 para NE y FVLA + NE para todas las dosis excepto -Log 8 n=4* (P< 0,05). n= número de experimentos.

En la Figura 3, se observa que el aumento del tono vascular producido por NE en los manguitos de aorta es significativamente mayor (P< 0,025), cuando los mismos están desprovistos de endotelio, para todas las concentraciones de NE ensayadas (10^{-8} - 10^{-4} M).

En la Figura 4, se aprecia que el aumento de tono vascular producido por NE en manguitos de aorta, se diferencia estadísticamente (P> 0,05) antes y después de incubarlos con una solución control (vehículo).

Comparación de los efectos de la norepinefrina sobre manguitos aislados de aorta torácica de rata con y sin endotelio

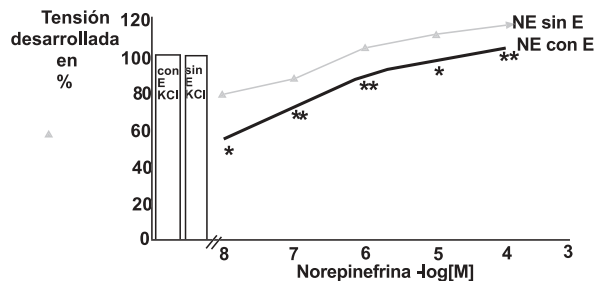


Figura 3. NE sin E: primera curva dosis-efecto de norepinefrina en manguitos con endotelio. NE con E: primera curva de dosis-efecto de norepinefrina en manguitos con endotelio. La tensión desarrollada por cada dosis acumulativa se expresa como el porcentaje de la respuesta contráctil máxima (100%) producida por una solución despolarizante con KCL 70 mM, en cada manguito; siendo la tensión desarrollada por la acción despolarizante: con E: $1,89 \pm 0,96$ g (n= 8) y sin E: $1,68 \pm 0,70$ g (n=7); P> 0,05. Las dosis se expresan como el logaritmo negativo de la concentración molar. Los valores son el promedio de n= 8 para todas las dosis excepto n=4 para -Log 8, en el grupo NE con E; y n= 7 para todas las dosis excepto n= 6 para las dosis -Log 8, en el grupo NE sin E* (P< 0,01) ** (P< 0,025).

n= número de experimentos.
E= endotelio.

Efecto de la norepinefrina sobre el tono de manguitos aislados de aorta torácica de rata, antes y después de incubarlos en una solución control

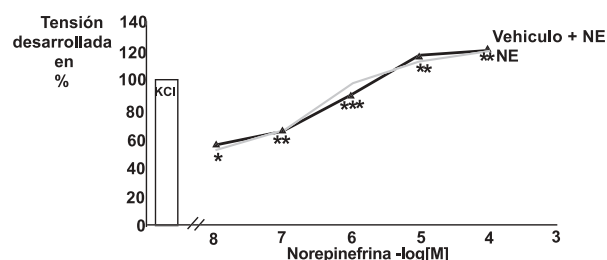


Figura 4. Curva de dosis respuesta de norepinefrina en manguitos aislados de aorta torácica de rata antes (NE) y después de añadir al baño una solución control (vehículo + NE). La tensión desarrollada por cada dosis acumulativa se expresa como el porcentaje de la respuesta contráctil máxima producida por una solución despolarizante con KCL 70 mM en cada manguito; siendo la tensión desarrollada por la acción despolarizante: $1,79 \pm 0,83$ g ($n=10$). Las dosis se expresan como el logaritmo negativo de la concentración molar. Los valores son el promedio de $n=10$ para NE y vehículo + NE para todas las dosis. *($P > 0,05$) **($P > 0,20$) y ***($P < 0,02$). n = número de experimentos (Por no haber diferencias se acumularon resultados de 5 experimentos con endotelio más 5 sin endotelio)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Cuando se compara el aumento de tono vascular producido por dosis creciente y acumulativas de norepinefrina (NE) en manguitos aislados de aorta torácica de rata con endotelio, antes y después de la incubación por FVLA, se observa una disminución altamente significativa ($P < 0,005$) de las tensiones desarrolladas por los manguitos a partir de las concentraciones 10^{-6} M hasta 10^{-4} M de NE. Para las concentraciones 10^{-8} M y 10^{-7} M, aunque si bien hay disminución de la fuerza, ésta no es estadísticamente significativa ($P > 0,05$) lo mismo observaron Illanes y col. (16) en relación con estas dosis más bajas al utilizar fenilefrina como vaso constrictor. Los mismos autores citan el efecto vasorrelajador del mencionado factor utilizando manguitos de aorta torácica de rata previamente contraídos por fenilefrina, no obstante, indagaron el posible mecanismo a través del cual este factor produce relajación vas-

cular o disminución del aumento del tono producido por tal vasoconstrictor adrenérgico. Se demuestra, en nuestro caso, que el FVLA también desempeña un papel en el organismo que contrarresta el efecto constrictor de un alfa adrenérgico.

La comparación de dos curvas de dosis-respuesta a norepinefrina a concentraciones crecientes y acumulativas de 10^{-8} M hasta 10^{-4} M, en manguitos aislados de aorta torácica de rata sin endotelio, antes y después de incubar el FVLA, demuestra que el aumento de tensión producido por la NE disminuye significativamente ($P < 0,05$) luego de la incubación con FVLA, para la dosis de NE 10^{-6} M, 10^{-5} M, y 10^{-4} M, respectivamente. Como en los vasos con endotelio, tampoco hay disminución significativa del tono para la dosis más bajas de 10^{-8} M y 10^{-7} M. Sin embargo, es evidente la tendencia de la acción del FVLA a disminuir el efecto vasoconstrictor de todas las concentraciones de NE y es sólo estadísticamente significativo para dosis más altas (10^{-6} M - 10^{-4} M). Es posible pensar que el aumento del número de experimentos haría significativo este efecto para todas las dosis.

Como hemos descrito, el FVLA obtenido y ensayado por nosotros en el laboratorio, disminuye significativamente el aumento de tono de la aorta de rata producido por un vasoconstrictor alfa adrenérgico como la NE. A su vez, hemos visto que el efecto vasorrelajador del FVLA, se ejerce también cuando las preparaciones de aorta han sido desprovistas de su endotelio.

Se han descrito numerosas sustancias que necesitan del endotelio para producir relajación vascular, liberando factor de relajación derivado del endotelio (FRED), y otras que prescinden del mismo para producir tal efecto (6,13). El FVLA obtenido por nosotros no requiere endotelio para producir su efecto relajador de la musculatura lisa del vaso; aunque, cuando hemos quitado el endotelio, se aprecia una menor acción relajadora. Esto se podría explicar por una desensibilización de la preparación al serle extraído mecánicamente el endotelio o que la FVLA ejerce su acción vasodilatadora al menos en parte a través de esta estructura del vaso; posiblemente induciendo liberación de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (ON). A este respecto, sería interesante utilizar bloqueadores específicos de la formación de ON como la N-monometil-L-arginina (L-NMMA), para evaluar el posible rol de este compuesto en el efecto citado del FVLA (21).

Se han descrito los efectos vasorrelajadores de

atriopeptinas sintéticas y de otros péptidos atriales sometidos a diversos procesamientos bioquímicos (12-14,22-27); describiéndose a su vez que varios de estos péptidos sintéticos producen efecto relajador en arterias aisladas, aun cuando se conserve o se le quite el endotelio vascular o se le quite el endotelio vascular (13,22,25,26). De manera que, según el efecto farmacológico producido por el FVLA, éste podría corresponderse con algunos de estos péptidos llamados comúnmente FNA o atriopeptinas, pero en condiciones estructurales fisiológicamente puro, porque en su obtención no ha sido sometida a ningún procesamiento físico-químico que no sea fisiológico. Por otro lado, Leonardo Gaete, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (comunicación personal) comprueba que las muestras tomadas de los baños que contienen en FVLA, producto de las distensiones controladas de las aurículas, luego de ser corridas en cromatografía líquida de alta presión y de comparar con el mismo procesamiento en paralelo de atriopeptina sigma, se obtiene la separación de un péptido con un peso molecular muy próximo al del compuesto sintético citado.

La comparación de dos grupos experimentales de manguitos de aorta torácica de rata, uno con endotelio y el otro sin él, en relación con las respuestas de ellos a la norepinefrina en dosis crecientes y acumulativas, demuestra que el aumento de tono vascular producido por NE es significativamente mayor cuando los mismos están desprovistos de endotelio, para todas las concentraciones de NE ensayadas ($P < 0,025$). Esto pone en evidencia la importancia del endotelio en la regulación de tono vascular aun *in vitro*, como ha sido descrito por otros autores. (17,18). En tal sentido, la presencia del endotelio funcional intacto parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la capacidad de los vasos de contraerse en respuesta a estimulación alfa-adrenérgica. Se ha postulado que los agonistas alfa-adrenérgicos podrían activar una liberación, mediada por receptores endoteliales, de FRDE, que podrían contrarrestar la vasoconstricción inducida por el agonista; la remoción de la capa endotelial podría eliminar este mecanismo y aumentar el efecto constrictor (18).

Cuando se comparan dos curvas de dosis-efecto a la norepinefrina a concentraciones crecientes y acumulativas desde 10^{-8} M hasta 10^{-4} M, en relación con el aumento del tono vascular de manguitos aislados de aorta torácica de rata, antes y después de

incubarlos con una solución control de KH sometida a igual proceso de almacenamiento que la muestra que contiene el FVLA, se observa que el aumento del tono vascular producido por la NE no se diferencia estadísticamente ($P > 0,10$) antes y después de la incubación con dicha solución. El hecho de que una segunda curva de dosis efecto sea igual a la primera, en nuestras condiciones experimentales en el grupo control, descarta un posible deterioro de las preparaciones de manguitos aislados de aorta durante el tiempo de experimentación empleado, así como la influencia del pH de almacenamiento de la muestra con FVLA. De igual forma, se descarta un posible efecto desensibilizador de una primera curva sobre una segunda de NE. A este respecto Furchgott y Bhadrakon en 1953 (28), describieron que si bien no existía diferencia significativa entre las elevaciones absolutas de contracción máxima entre dos curvas de dosis efecto sucesivas, la sensibilidad de un espiral a la epinefrina y norepinefrina disminuyó en una segunda curva respecto de la primera. Esta reducción fue más marcada en niveles de contracción por debajo de la contracción máxima, requiriéndose de 2 a 5 veces más norepinefrina o epinefrina en la segunda curva de dosis respuesta que en la primera, para producir efectos equivalentes. A niveles más altos de contracción, la diferencia de sensibilidad llegó a ser menos marcada. Por otro lado según Hu y col. (29), la exposición prolongada de vasos sanguíneos a las catecolaminas produce desensibilización del músculo liso vascular mediada por receptores alfa-1 adrenérgicos.

Merece atención que en nuestros experimentos control obtuvimos disminución significativa ($P < 0,02$) del tono de los manguitos para la dosis 10^{-6} M NE de la segunda curva dosis-efecto, hallazgo éste que por ser aislado de las otras cuatro dosis ensayadas, preferimos no darle relevancia porque no oscurece el fenómeno global como se evidencia en la Figura 3, y que sin este valor excepcional, confirma los experimentos control realizados por otro de nosotros, cuando lo hizo, con fenilefrina (16); no obstante, no se descarta que algún fenómeno de desensibilización pudiera estar ocurriendo específicamente para esta dosis submáxima de NE.

En el grupo control no se encontró diferencia entre los manguitos con endotelio y sin éste, lo que concuerda con que el FVLA no necesita de esta estructura para producir su efecto relajador.

En relación con la prueba funcional del endotelio

descrita por Furchgott y Zawadzki (2), hemos introducido un criterio cuantitativo mediante el cual consideramos presencia de endotelio funcional cuando la relajación, producida por una dosis de acetilcolina 10^{-3} M en el manguito previamente contraído con una dosis de NE 10^{-6} M, es \geq al 12%; y ausencia de endotelio funcional cuando la relajación es $<$ del 12%, no se produce respuesta relajadora o por el contrario, aumenta el tono vascular. Este criterio nos ha servido para definir mejor la presencia o ausencia de endotelio funcional en las preparaciones. La acción contráctil a la acetilcolina que se observa en algunos vasos desprovistos de endotelio, ha sido descrita por otros autores (2) y demuestra que la acetilcolina además de liberar el factor endotelial de relajación vascular (FRDE), ejerce también una acción constrictora directa o indirecta liberando factores contráctiles del músculo liso vascular. En relación con la prueba funcional de la integridad de la preparación de manguitos aislados de aorta, con solución despolarizante KCL 70 mM, no encontramos diferencia significativa ($P > 0,05$) en manguitos con endotelio y sin él, hallazgo éste que concuerda con lo citado por Vinet y col. (18).

En conclusión, el FVLA obtenido y ensayado por nosotros antagoniza la acción vasoconstrictora de la NE en manguitos aislados de aorta torácica de rata y no requiere del endotelio vascular para producir su efecto relajador.

REFERENCIAS

- De Bold AJ, Berenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94.
- Furchgott RF, Zawadzky JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- Cantin M, Genest J. The heart as an endocrine gland. *Sci Amer* 1986;254(2):62-67.
- Jelliffe RW. Dilator and constrictor effects of acetylcholine on isolated rabbit aortic chains. *J Pharmac Exp Ther* 1962;135:349-353.
- Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992;86(Suppl III):12-19.
- Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1984;24:175-197.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
- Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:535-560.
- Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble s-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990;345:161-163.
- Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 1990;81:1586-1593.
- Harrison DG, Kurz MA, Quillen JE, Sellke FW, Mugge A. Normal and pathophysiologic considerations of endothelial regulation of vascular tone and their relevance to nitrate therapy. *Am J Cardiol* 1992;70:11B-17B.
- Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylan JG, Yusheng W, Holmberg SW, Needleman P. Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 1993;221:71-73.
- Winqvist RJ, Faison EP, Waldman S, Schwartz K, Murad F, Rapoport RM. Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1984;81:7661-7664.
- Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fork K, Adams SP, Eubanks SR, et al. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides. *Science* 1984;233:67-69.
- De Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 1985;230:767-770.
- Illanes AG, Penna M, Martinez JL. The vascular relaxing effect of a factor released by rat atria distension. *Gen Pharmac* 1993;24(2):315-319.
- Carrier GO, White RE. Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J Pharmac Exp Ther* 1985;232(3):682-687.
- Vinet R, Brieva C, Pinaridi G, Penna M. Modulation of alpha-2-adrenergic induced contractions by endothelium in rat aorta. *Gen Pharmac* 1991;22:137-142.
- Bahn AK. Basic medical statistics. New York and London: Grune Stratton Inc.; 1972;245:144-156.
- Scheffler WC. Bioestadística. México, DF: Fondo Educativo Interamericano, SA; 1981:79-84.

21. Ress DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989;96:418-424.
22. Winquist RJ. The relaxant effects of atrial natriuretic factor on vascular smooth muscle. *Life* 1985;37(12):1081-1087.
23. McMahon EG, Marshall WG. Vasorelaxant effects of atriopeptins in human internal mammary artery. *Eur J Pharmacol* 1988;155:155-158.
24. García R, Thibaut G, Cantin M, Genest J. Effect of purified atrial factor on rat rabbit vascular strips and vascular beds. *Am J Physiol* 1984;247:R34-R39.
25. Genest J, Cantin M. Atrial natriuretic factor. *Circulation* 1987;75(suppl I):1-118-124.
26. Winquist RJ. Possible mechanism underlying the vasorelaxant response to factor natriuretic atrial. *Federation Proc* 1986;45:2371-2375.
27. Lanese DM, Yuan BH, Falk SA, Conger J. Effects of atriopeptin III on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 1991;261:F1102-F1109.
28. Furchgott RF, Bradrakon S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinefrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J Pharmac Exp Ther* 1953;108:129-143.
29. Hu Z, Honda K, Murad F, Hoffman B. Prolonged exposure to catecholamines enhances sensitivity of smooth muscle relaxation induced by sodium nitroprusside and atriopeptin. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;260(2):756-761.

“Valor incierto del control electrónico fetal en la predicción de la parálisis cerebral”

“El control electrónico fetal fue desarrollado para detectar los patrones de los latidos cardíacos fetales supuestamente indicadores de hipoxia. Se pensó que el reconocimiento precoz de la hipoxia podría alertar al clínico sobre los potenciales problemas y, los capacitaría para intervenir rápidamente y evitar la muerte fetal o un daño cerebral irreversible. Cuando se introdujo el control electrónico fetal, hubo la esperanza de que el uso de esta técnica podría prevenir la mayoría de las lesiones del parto debidas a hipoxia o asfixia, y se reduciría grandemente la frecuencia de la parálisis cerebral y el retardo mental. La introducción y amplia diseminación de este control fetal ocurrió antes que pruebas clínicas aleatorias hubiesen evaluado su eficacia. Después de 20 años y 11 pruebas aleatorias, el control electrónico fetal parece tener poco beneficio documentado sobre la auscultación intermitente, con respecto a mortalidad perinatal o el desenlace neurológico a distancia. Además, probablemente debido al amplio uso del control electrónico fetal, la tasa de cesáreas ha aumentado, con un resultante aumento de la morbilidad materna y en los costes, pero sin aparente disminución de la incidencia de parálisis cerebral.

Pocos de los ensayos hechos hasta ahora han sido suficientemente grandes, o han durado el tiempo necesario, para investigar una posible asociación entre los hallazgos del control electrónico fetal y un

relativamente raro desenlace como la parálisis cerebral, la cual no puede ser diagnosticada con seguridad sino años después del parto. Ninguna prueba aleatoria ha explorado la posible asociación entre los patrones de latidos cardíacos específicos, detectados en el control electrónico, y los cuadros neurológicos a largo plazo.

En un estudio de población, hemos evaluado la asociación de la parálisis cerebral en niños con pesos de 2 550 gramos o más, con patrones específicos del control electrónico fetal, y analizamos los posibles factores de confusión. Investigamos la utilidad del control electrónico fetal como fue interpretado por los médicos tratantes en el momento del parto de niños que, más tarde, fueron diagnosticados como con parálisis cerebral.....

Hallazgos anormales específicos en los trazados electrónicos de los latidos cardíacos estuvieron asociados con un aumentado riesgo de parálisis cerebral. Sin embargo, la tasa de falsos positivos fue extremadamente alta. Puesto que la cesárea es hecha a menudo cuando tales anomalías son notadas y ella está asociada con riesgos para la madre, nuestros datos originan la preocupación de que, si estas indicaciones son ampliamente usadas, muchas cesáreas serán hechas sin beneficio y con el potencial de hacer daño” (Nelson K, Dambrosia JM, Ting TV, Grether JK. *N Engl J Med* 1996;334:613-618.)