Influencia del sistema nitridérgico en la respuesta contráctil a fenilefrina de anillos de vasos usados en revascularización coronaria

Juan C Prieto^{1,2}, Gianni Pinardi², Jaime Zamorano¹, Ernesto Larraín¹, Cristián Bermúdez¹, Rodrigo Castillo¹, Verónica Cisternas^{1a}, Hugo F Miranda^{2b}.

Modification of phenylephrine induced contraction of human vessel rings by L-arginine and L-arginine methyl ester

Background: Endothelial dysfunction is associated to a lower production of nitric oxide and a reduction of endothelium mediated vasodilation. **Aim:** To study the effects of pharmacological agents that modify nitric oxide synthetase (NOS) activity on tension changes induced by phenylephrine in rings of internal mammary and radial arteries and saphenous vein. **Material and methods:** Vessel rings of 7 to 10 mm length were obtained from 32 patients subjected to coronary vascular surgery. Fourteen samples of radial artery, 12 samples of internal mammary artery and 15 samples of saphenous vein were obtained. A maximal contraction was induced with KCl and dose response curves for phenylephrine (FE) in the absence or presence of L-arginine and L-arginine methyl ester (L-NAME), were constructed. **Results:** The tension induced by FE in internal mammary artery and saphenous vein reached a maximum, near 90% of 80 mM KCl-induced contraction, but in the radial artery, it reached a maximum of 63% ($p < 0.05$). In all vessels, the dose response curves were significantly shifted to the right by L-arginine and to the left by L-NAME. **Conclusions:** Pre-incubation of human rings with L-ARG or L-NAME, changed the response to FE induced contraction, which may be related to different degrees of endothelial nitric oxide production or NO sensitivity. The basal NO production in radial artery seems to be larger than the other vessels (Rev Méd Chile 2007; 135: 1231-36).

(Key words: Endothelium, vascular; Nitric oxide; Phenylephrine)

Recibido el 15 de noviembre, 2006. Aceptado el 3 de mayo, 2007.

Trabajo financiado por proyecto OAIC # 02103 del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

¹Centro Cardiovascular, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. ²Programa de Farmacología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^aEnfermera

^bLicenciado en Biología

Correspondencia a: Dr. JC Prieto. Programa de Farmacología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia 1027, Santiago 7, Chile. Teléfono: 56-2-978-6050. Fax: 56-2-737-2783. E mail: jprieto@med.uchile.cl

Los vasos utilizados con mayor frecuencia en cirugía coronaria, para confeccionar puentes en revascularización miocárdica, son la arteria mamaria interna (AMI), la vena safena (VS) y la arteria radial (AR). Sin embargo, la heterogeneidad funcional del endotelio en los distintos vasos puede ser determinante para el éxito tanto en el posoperatorio inmediato como el posoperatorio a largo plazo¹. Generalmente, se prefieren los conductos arteriales por su mayor tasa de permeabilidad en el tiempo comparado con los confeccionados con venas, cuando el puente es efectuado en sitios anatómicos equivalentes². La diferencia en la permeabilidad a largo plazo entre arterias y venas, se explicaría, entre otros factores, por características específicas de los conductos, tales como la producción endotelial de óxido nítrico (NO). Se acepta que la deficiencia de NO en enfermedades de arterias coronarias o periféricas es predictiva de futuros eventos cardiovasculares^{3,4}. Además, la AR y la AMI tienen diferentes características biológicas, especialmente relacionadas con el grosor de la capa muscular y los niveles de producción de prostaciclina⁵⁻⁷.

Las células endoteliales están relacionadas estrechamente con la regulación del tono vascular, inflamación, regulación de factores de crecimiento, trombolisis, lipólisis y antiagregación plaquetaria⁸. Muchas de estas funciones están asociadas con la producción endotelial de NO debido a la conversión de L-arginina a L-citrulina, proceso catalizado por la enzima constitutiva óxido-nitrosintasa endotelial (e-NOS o NOS III)^{1,9}. El NO media la vasodilatación dependiente de endotelio, oponiéndose a los efectos de potentes vasoconstrictores derivados de endotelio tales como angiotensina II y endotelina⁴. La relajación de las células musculares lisas de los vasos depende de la activación de la guanilciclase soluble y del incremento de GMPc¹⁰.

La disfunción endotelial es reconocida actualmente como un importante proceso en la patogénesis de la aterosclerosis. Se manifiesta precozmente como resultado de la exposición de las células endoteliales a factores de riesgo cardiovascular tales como edad avanzada, tabaquismo, diabetes, hipertensión o dislipidemia^{11,12}.

La disfunción endotelial se acompaña de una reducción en la producción de NO^{1,13} y una reducción crítica de la vasodilatación mediada por

endotelio. El éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), un inhibidor no selectivo de NOS *in vivo* e *in vitro*, es capaz de reducir significativamente la producción y liberación de NO¹⁴. Por otra parte, puesto que la L-arginina (L-ARG) es el precursor en la síntesis endógena de NO, se ha demostrado que la administración aguda o crónica de L-arginina *in vivo*, mejora la respuesta vasodilatadora, probablemente por un incremento de la producción de NO¹⁵.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de fármacos que modifican la actividad de la NOS, sobre los cambios de tensión inducidos por el agonista selectivo α 1-adrenérgico fenilefrina (FE) en anillos de AMI, AR y VS humana. Al mismo tiempo, se determinó si existen diferencias en la respuesta contráctil entre los diferentes vasos empleados en revascularización coronaria.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de muestras. Se usaron muestras de AR, n =14, AMI, n =12 y VS, n =15 obtenidas de 32 pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile entre mayo de 2003 y junio de 2004. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. Se obtuvieron anillos de aproximadamente 7-10 mm de longitud de cada vaso, los cuales no eran sometidos a lavados con solución salina o vasodilatadores. Las muestras se mantuvieron en una solución Tyrode modificada con la siguiente composición, en mM: NaCl 119,7, KCl 5,3, CaCl₂ 2,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 23,8, glucosa 11,1¹⁶, mantenida a 4°C. Los anillos de vasos se prepararon en el laboratorio dentro de los 30 min después de su obtención.

Estudios vasculares. Los anillos fueron montados para su estudio *in vitro* en ganchos de acero inoxidable y colocados en baños para órganos de 25 mL con solución Tyrode mantenida a 37°C, burbujeada continuamente con una mezcla de 95% O₂/5% CO₂, tal como se ha descrito en trabajos previos¹⁶. Uno de los extremos se unió a un transductor Grass de fuerza desplazamiento (FT 0,3), que estaba conectado a un polígrafo

Grass model 7 (*Grass Instruments*, Quincy, Mass, U.S.A.), destinado a registrar los cambios de tensión. El otro extremo estaba fijo al fondo interior del baño. Los anillos arteriales y venosos fueron estabilizados durante 60 min, sometidos a una tensión basal de 1,5 y 1 g, respectivamente, reemplazando la solución Tyrode cada 15 min.

Después del período de estabilización, los anillos fueron contraídos en dos ocasiones con una solución salina de 80 mM de KCl, hasta alcanzar la respuesta máxima y por sucesivos cambios del Tyrode se alcanzaba la línea basal. La mayor respuesta a K^+ , fue considerada como contracción basal. Después de obtenida la línea basal, se construyó una curva dosis respuesta a FE (10^{-6} - $10^{-3,5}$ M) en dosis acumulativas de $\frac{1}{2}$ unidad logarítmica. Una vez obtenida la respuesta contráctil máxima, se procedió al lavado de la preparación con la solución Tyrode para alcanzar la tensión basal inicial.

Posteriormente se incubó durante 60 min ya sea con: a) 80 μ M de L-ARG, o b) con 200 μ M de L-NAME. Se confeccionó una segunda curva dosis-respuesta a FE, en presencia de L-ARG o L-NAME. Al final del experimento, cada anillo fue pesado después de secarlo con papel filtro. La concentración de los fármacos se expresó como concentración final en el baño.

Análisis de los datos. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ error estándar (ES). Los cambios de tensión por KCl se expresaron como mg de tensión desarrollada por cada anillo y los por FE, como porcentaje de la máxima tensión inducida por KCl. El análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta a FE antes y después de L-ARG o L-NAME fue hecho por el test de t de Student para muestras pareadas y las diferencias entre los tres grupos de vasos fueron analizadas por ANOVA seguido del test de Student-Neuman-Keuls. La significancia estadística se aceptó al nivel de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Características de los pacientes. El perfil clínico de los pacientes incluidos comprende 38% con historia de infarto agudo del miocardio; 35% con antecedentes de angina inestable y 55% de angina estable. Ningún paciente había sido sometido a

cirugía coronaria previa y 17% tenía antecedentes de angioplastia.

Respuesta contráctil a KCl. La respuesta contráctil a 80 mM de KCl –expresada en mg de tensión– para cada tipo de vaso fue de 370 ± 70 para AMI, 1.400 ± 150 para VS y 2.350 ± 410 para AR ($p < 0,05$ en todas las comparaciones).

Efecto de L-ARG. La exposición a 80 μ M de L-ARG durante 60 min no produjo cambio en la tensión basal de los segmentos arteriales o venosos.

Las curvas dosis-respuesta basales a FE generaron las siguientes tensiones máximas expresadas como porcentaje de la contracción inducida por KCl: AMI $91 \pm 15,2\%$, VS $97,5 \pm 7,0\%$ y AR que alcanzó un máximo significativamente menor de $65,5 \pm 9,0\%$ ($p < 0,05$).

La incubación de los segmentos de AMI, AR y VS con L-ARG, determinó un desplazamiento de la curva dosis-respuesta a FE hacia la derecha, como puede observarse en la Figura 1, que se acompañó de una significativa disminución de la tensión máxima desarrollada con los siguientes valores $31,3 \pm 5,7\%$ para IMA, $33 \pm 4,3\%$ para RA y $54,2 \pm 6,3\%$ para VS.

Efecto de L-NAME. La tensión basal de los anillos arteriales y venosos no se modificó con la exposición a 200 μ M de L-NAME, durante 60 min.

La Figura 2 muestra que los valores de las curvas dosis-respuesta basales a FE, expresadas como porcentaje de la contracción inducida por KCl, alcanzan un máximo de $95,7 \pm 10,3\%$ para AMI y de $100 \pm 10\%$ para VS. Sin embargo, para la AR se alcanzó un valor de $61 \pm 7,6\%$ ($p < 0,05$).

Las curvas dosis-respuesta obtenidas después de la incubación con 200 μ M de L-NAME presentaron un desplazamiento hacia la izquierda, acompañado de un significativo aumento de la tensión máxima cuyos valores relativos a KCl fueron de $122,5 \pm 11\%$ para AMI, $128 \pm 12\%$ para VS y $103 \pm 10,5\%$ para AR.

DISCUSIÓN

Los segmentos de vasos provenientes de pacientes portadores de cardiopatía coronaria, presentan respuesta contráctil a la administración de KCl o

Figura 1. Efecto de L-arginina (L-ARG, 80 μM) en la tensión inducida por fenilefrina (FE) en anillos de arteria mamaria interna (AMI), panel A; en arteria radial (AR), panel B y en vena safena (VS), panel C. Los cambios se expresan en porcentaje de la respuesta máxima a 80 mM KCl. Cada punto representa el promedio ± ES de 6 a 7 experimentos. Curva dosis-respuesta antes (●) y después (○) de la incubación con L-ARG. * = p < 0,05.

Figura 2. Efecto de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 200 μM) en la tensión inducida por fenilefrina (FE) en anillos de arteria mamaria interna (AMI), panel A; en arteria radial (AR), panel B y en vena safena (VS), panel C. Los cambios se expresan en porcentaje de la respuesta máxima a 80 mM KCl. Cada punto representa el promedio ± ES de 6 a 8 experimentos. Curva dosis-respuesta antes (●) y después (○) de la incubación con L-NAME. * = p < 0,05.

FE, sin que se observe cambios en la tensión basal con la administración de L-NAME y L-ARG. Estudios previos muestran que la adición de L-ARG produce vasodilatación¹³ y la de L-NAME produce actividad contráctil^{14,17,18}, en los mismos tipos de vasos. Estas discordancias podrían deberse a las diferencias entre los protocolos utilizados, composición de la solución fisiológica salina, dosis de L-ARG o L-NAME, presencia de indometacina para inhibir síntesis de prostanoïdes o precontracción de los vasos en 20% del máximo efecto de KCl.

Sin embargo, en concordancia con estudios previos¹⁸, el pretratamiento con L-NAME, induce un mayor grado de contracción a FE en la AR (Δ 42%) que en la VS (Δ 28%) y la AMI (Δ 26,8%). La incubación con L-ARG produce un menor grado de contracción a FE en AMI (Δ 60%), en VS (Δ 43%) y en AR (Δ 33%)¹³.

El análisis de la contracción máxima basal desarrollada por la administración de FE, tanto en los conductos preincubados con L-NAME como con L-ARG, sugieren que en la AR existe una mayor capacidad basal de producción de NO, coincidente con otros estudios que le asignan a esta arteria una relativa mayor actividad de NOS, tanto en condiciones basales como por activación colinérgica comparada con los otros vasos¹⁷.

Además, el presente estudio está de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo de Guzik y cols¹⁸, quienes usando los mismos segmentos de vasos, compararon la biodisponibilidad de NO, a través de la relajación inducida por acetilcolina y por la respuesta contráctil adicional a L-NAME en vasos precontraídos con FE. Esta última metodología es considerada un bioensayo de la biodisponibilidad de NO usando un método mecánico de tensión isométrica, más que un ensayo de agonismo farmacológico¹⁹.

Por otra parte, la contracción dosis-dependiente inducida por FE es potenciada por el pretratamiento con L-NAME, lo que es explicado por el bloqueo de la síntesis de NO. Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo no indican de manera directa que la producción de NO es mayor en la AR que en la AMI o VS, no se puede descartar una diferencia en la sensibilidad al NO. La menor contracción en presencia de L-ARG es

explicada por el rol de precursor de la síntesis de NO propia de este aminoácido¹⁵.

Las arterias radial y mamaria interna poseen diferentes características anatómicas y fisiológicas⁷. La AR tiene una gruesa capa muscular de aproximadamente 500 μ m, en comparación a los cerca de 300 μ m que posee la AMI²⁰. Estas diferencias podrían explicar la diferente respuesta contráctil a FE debido a los distintos niveles en la regulación de NOS, fenómeno que ya ha sido descrito para las diferencias encontradas en la producción basal de prostaciclina, en estas arterias⁶. De este modo se explicaría la variación en la actividad contráctil miogénica inducida por KCl en los diferentes vasos.

La integridad del endotelio y una adecuada producción de NO son elementos claves en la regulación vascular²¹. La reducción en la biodisponibilidad de NO está involucrada en el inicio, progresión y complicaciones de la aterosclerosis⁴. Puesto que los vasos usados en este estudio provienen de pacientes con enfermedad coronaria demostrada, es razonable suponer que ellos podrían tener diferentes grados de disfunción endotelial de base, aunque en el presente trabajo no se midió directamente la relajación inducida por acetilcolina.

La disfunción endotelial progresa con la edad. El envejecimiento puede estar asociado con una menor disponibilidad de NO, lo cual puede conducir a una reducción marcada de la capacidad vasodilatadora (disfunción endotelial), asociada a la disminución de la producción de otros agentes vasodilatadores o al aumento de factores vasoconstrictores, tales como los relacionados con los receptores α -adrenérgicos²².

En conclusión, el pretratamiento *in vitro* con L-ARG o con L-NAME, de anillos de AR, AMI o VS provenientes de cirugía de revascularización coronaria, mostraron diferencias en la tensión máxima inducida por FE en cada tipo de vaso, lo que podría estar relacionado con diferentes grados de producción endotelial de NO o diferencias en su sensibilidad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a J. López, A. Correa, R. Zepeda y E. Prado por su eficiente asistencia técnica.

REFERENCIAS

1. DZIMIRI N, CHESTER AH, ALLEN SP, DURÁN C, YACOB MH. Vascular reactivity of arterial coronary artery bypass grafts - Implications for their performance. *Clin Cardiol* 1996; 19: 165-71.
2. MILLS N. Arterial grafts for coronary artery bypass. *Adv Card Surg* 1997; 9: 195-216.
3. DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: (Suppl. III), III-27 - III-32.
4. LUSCHER TF, YANG Z, TSCHUDI M, VON SEGESER L, STULZ P, BOULANGER C ET AL. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Cardiovasc Res* 1990; 66: 1088-94.
5. CHESTER AH, MARCHBANK AJ, BORLAND JAA, YACOB MH, TAGGART DP. Comparison of the morphologic and vascular reactivity of the proximal and distal radial artery. *Ann Thorac Surg* 1988; 65: 1972-7.
6. CHARDIGNY CI, VAN DER PERRE K, SIMONET S, DESCOMBES JJ, FABIANI JN, VERBEUREN TT. Platelets and prostacyclin in arterial bypasses: implications for coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 513-19.
7. NAKAMURA K, AL-RUZZEH S, CHESTER AH, SCHMIDT I, BARBIR M, YACOB MH, AMRANI M. Effects of cerivastatin on vascular function of human radial and left internal thoracic arteries. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1860-5.
8. LANDMESSER U, HORNIG B, DREXLER H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: [Suppl. II], II-27 - II-33.
9. ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, functions and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
10. PALMER RJ, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 1251-6.
11. LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
12. LAUFS U. Beyond lipid-lowering effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 58: 719-31.
13. VALLANCE P, COLLIER J, MONCADA S. Nitric oxide synthesized from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human veins *in vivo*. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 1053-7.
14. REES DD, PALMER RMJ, SCHULZ R, HODSON HF, MONCADA S. Characterization of 3 inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-52.
15. BÖGER RH, BODE-BÖGER SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 79-99.
16. PINARDI G, BRIEVA C, LÓPEZ J, CORREA A, MIRANDA HF. Alpha-1 adrenoceptor subtypes in the mesenteric vasculature and thoracic aorta of the rat. *Pharmacol Rev Commun* 1997; 9: 205-13.
17. SHAPIRA OM, XU A, ALDEA GS, VITA JA, SHEMIN RJ, KEANEY JR JF. Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation* 1999; 100: (Suppl. II), II-322 - II-327.
18. GUZIK TJ, WEST NEJ, PILLAI R, TAGGART DP, CHANNON KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-94.
19. FLEMING I, BAUERSACHS J, SCHAFER A, SCHOLZ D, ALDERSHVICE J, BUSSE R. Isometric contraction induces the Ca^{2+} -independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1123-8.
20. VAN SON JAM, SMEDTS F, VINCENT JG, VAN LIER HJJ, KUBAT K. Comparative anatomical studies of various arterial conduits for myocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 703-7.
21. CABLE DG, CACCITOLO JA, PFEIFER EA, DALY RC, DEARANI JA, MULLANI CJ ET AL. Endothelial regulation of vascular contraction in radial and internal mammary arteries. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1083-90.
22. TORO L, MARIJC J, NISHIMARU K, TANAKA Y, SONG M, STEFANI E. Aging, ion channel expression and vascular function. *Vasc Pharmacol* 2002; 38: 73-80.