

Los Receptores Muscarínicos y la Estimulación Colinérgica Central en Ratas con Desnervación Sinoaórtica

Carlos Alberto TAIRA

*Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956 5° piso, Buenos Aires 1113, Argentina.*

RESUMEN. Estos estudios evaluaron la participación de receptores muscarínicos centrales en la respuesta presora a la administración central de neostigmina, un anti-colinesterásico cuaternario, en ratas conscientes con operación simulada o con desnervación sinoaórtica. El efecto presor dependiente de dosis de neostigmina (0,1-1 µg, icv) fue significativamente mayor en las ratas con desnervación sinoaórtica que en aquellas con la operación simulada. El antagonista de receptores muscarínicos M₃ 4-DAMP (0,3 nmol icv), pero no el antagonista M₁ pirenzepina (0,3 nmol icv), previno el efecto presor de neostigmina (0,1 - 1 µg icv) en ambos grupos de ratas. Las diferencias en el efecto presor de neostigmina (icv) entre las ratas con operación simulada y las desnervadas podrían deberse a una actividad diferente de las vías colinérgicas. Los resultados también sugieren una participación de receptores muscarínicos M₃ cerebrales en el efecto presor de neostigmina (icv) en ambos grupos de ratas.

SUMMARY. "Muscarinic Receptors and Central Cholinergic Stimulation in Rats with Sinoaortic Denervation". These studies evaluated the participation of central muscarinic receptors in the pressor effect of centrally injected neostigmine, a quaternary anticholinesterase, in conscious sham operated and sinoaortic denervated rats. Dose-dependent pressor effect of neostigmine (0,1-1 µg icv) was significantly greater in sinoaortic denervated rats than in sham operated animals. The M₃ muscarinic receptor antagonist 4-DAMP (0,3 nmol icv), but not the M₁ antagonist pirenzepine (0,3 nmol icv), prevented the pressor effect of neostigmine (0,1 - 1 µg icv) in both groups of rats. Differences in the pressor effect of neostigmine (icv) between sham and sinoaortic denervated rats could be due to a different activity of cholinergic pathways. The results also suggest a brain M₃ muscarinic receptors involvement in the pressor effect of neostigmine (icv) in both groups of rats.

INTRODUCCION

Es bien sabido que la acetilcolina cerebral tiene un papel de modulador en los mecanismos de regulación cardiovascular barorrefleja¹ y que el incremento en la actividad colinérgica en el sistema nervioso central podría participar en el desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión en modelos experimentales tales co-

PALABRAS CLAVE: Desnervación sinoaórtica, Efecto presor, Receptor muscarínico, Neostigmina, 4-DAMP, Pirenzepina.

KEY WORDS: Sinoaortic denervation, Pressor effect, Muscarinic receptor, Neostigmine, 4-DAMP, Pirenzepine.

mo la rata con hipertensión espontánea, la DOCA-salina y la hipertensa por coarctación aórtica ². En la desnervación sinoaórtica, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que las respuestas cardiovasculares mediadas por mecanismos colinérgicos centrales estarían alterados en las ratas desnervadas ^{3,4}.

Recientemente, se ha sugerido que los receptores muscarínicos M₃ podrían estar involucrados en los mecanismos de la respuesta presora a la administración sistémica de fisostigmina, un anticolinesterásico terciario ⁵, o a la administración intrahipotalámica del agonista muscarínico carbacol ⁶.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los subtipos de receptores muscarínicos centrales que mediarían el efecto presor de la administración intracerebral de neostigmina, un anticolinesterásico cuaternario, en ratas conscientes con una operación simulada y en animales con desnervación sinoaórtica, utilizando para ello bloqueantes muscarínicos específicos como el antagonista de receptores M₁ pirenzepina y el antagonista de receptores M₃ 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metilioduro (4-DAMP) ⁷.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con ratas Wistar de cualquier sexo (200 a 250 g). Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (250 mg.kg⁻¹, i.p.) y la región ventral del cuello fue infiltrada subcutáneamente con lidocaína (0,5%). La desnervación sinoaórtica fue realizada según el método de Krieger ⁸. En las ratas controles se realizó una operación simulada. Los experimentos se realizaron 7 días después de la operación correspondiente.

Dos días antes de los experimentos, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (250 mg.kg⁻¹, i.p.) y colocadas en un aparato estereotáxico. Una cánula guía de acero inoxidable 23G fue implantada en el ventrículo lateral izquierdo de acuerdo a las siguientes coordenadas: A 5,8 mm, L 1,5 mm y H 3,5 mm ⁹. La cánula guía fue asegurada al cráneo con cemento acrílico dental y tornillos. Luego del implante de la guía, cada rata recibió una dosis de 50.000 U (i.m.) de penicilina G.

Para el registro de la presión sanguínea arterial, el día anterior al experimento, las ratas fueron anestesiadas con éter y se les insertó una cánula de polietileno (PE-50) heparinizada (25 U.ml⁻¹) en la arteria femoral derecha. Luego la cánula fue pasada bajo la piel hasta hacerla emerger por el dorso de los animales, a la altura del cuello. En el día del experimento, la cánula arterial fue conectada a un transductor de presión Statham Gould P231D acoplado a un polígrafo Grass 79D. A partir de los registros obtenidos de presión arterial se calculó el valor de presión arterial media (PAM) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{presión diastólica} + \frac{(\text{presión sistólica} - \text{presión diastólica})}{3}$$

La inyección i.c.v. de neostigmina fue hecha insertando una aguja inyectora (27G) en la cánula guía implantada en el ventrículo lateral. La aguja inyectora fue conectada a un jeringa Hamilton de 5 µl. La neostigmina, disuelta en solución salina, fue inyectada en un volumen de 0,5 µl. La velocidad de inyección fue de 1 µl.min⁻¹.

Todas las dosis de las drogas están expresadas en función de la base libre.

Las drogas utilizadas fueron: neostigmina bromuro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pirenzepina clorhidrato (Microsules-Bernabó SRL, Buenos Aires, Argentina) y 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metilbromuro (4-DAMP, donación del Dr. R.B. Barlow, Glasgow, UK).

Los resultados están expresados como la media \pm EEM. Las significancias estadísticas fueron calculadas mediante el análisis de la varianza y el test de "t" de Student ¹⁰.

RESULTADOS

Siete días después de la operación correspondiente, los valores de presión arterial media (PAM) medidos en ratas conscientes fueron similares en las ratas controles con operación simulada (PAM: 104,8 \pm 1,7 mm Hg; n = 15) y en los animales con desnervación sinoaórtica (PAM: 102,8 \pm 5,0 mm Hg; n = 15).

La Figura 1 muestra el curso temporal de los cambios en PAM inducidos por la administración i.c.v. de neostigmina (0,3 μ g) en ratas con operación simulada y con desnervación sinoaórtica. El anticolinesterásico indujo un incremento de la PAM en ambos grupos de ratas, observándose el máximo efecto a los 10 min de administrado en las ratas con operación simulada (Δ PAM: 25,2 \pm 2,9 mm Hg, n = 5) o con desnervación sinoaórtica (Δ PAM: 45,6 \pm 3,0 mm Hg, n = 5, p < 0,01 vs. ratas con operación simulada).

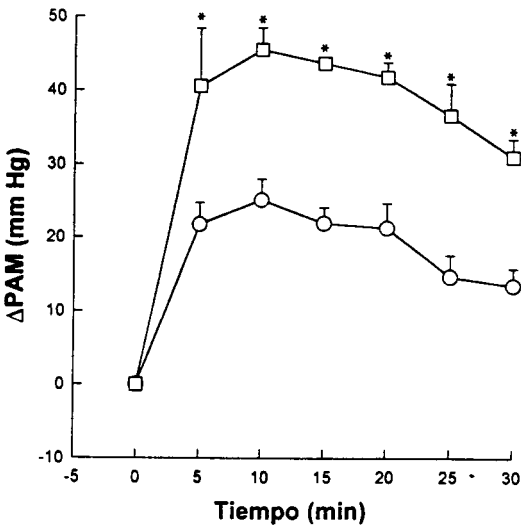


Figura 1. Curso temporal de los cambios de presión arterial media (PAM), inducido por la administración i.c.v. de neostigmina (0,3 μ g) en ratas con operación simulada (círculos) y en animales con desnervación sinoaórtica (cuadrados). Cada punto representa la media \pm E.E.M. de cinco experimentos.

El análisis de la varianza muestra que el componente entre grupos es significativo con p < 0,01 y $F_{(1,5)} = 831,603$.

* al menos p < 0,05 comparado contra el valor de ratas con operación simulada (test de "t" de Student no pareado).

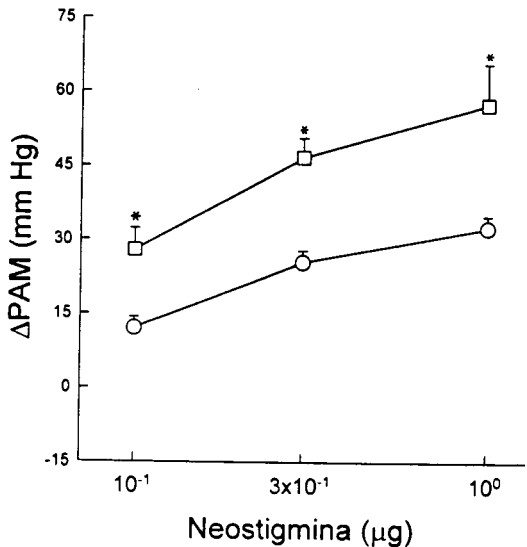


Figura 2. Curva de respuesta en función de dosis de neostigmina para los cambios de presión arterial media (PAM) inducidos en ratas con operación simulada (círculos) y en animales con desnervación sinoaórtica (cuadrados). Cada punto representa la media \pm E.E.M. de cinco experimentos.

El componente entre grupos del análisis de la varianza es significativo con p < 0,01 y $F_{(1,24)} = 31,700$.

* al menos p < 0,01 comparado contra el valor de ratas con operación simulada (test de "t" de Studente no pareado).

En la Figura 2 se observa que el efecto presor de la neostigmina (0,1 - 1 µg) mostró ser también dependiente de la dosis y fue, además, mayor en las ratas con desnervación sinoaórtica que en las controles con operación simulada.

La administración previa del antagonista muscarínico M₁ pirenzepina (0,3 nmol i.c.v.) no modificó el incremento de la PAM inducido por la neostigmina (0,1 - 1 µg) en las ratas con operación simulada y en las desnervadas, mientras que el antagonista M₃ 4 DAMP (0,3 nmol i.c.v.) previno significativamente la respuesta presora al anticolinesterásico en ambos grupos de animales (Figura 3). La administración de los antagonistas antes de la neostigmina no alteró el valor basal de PAM de las ratas con operación simulada y con desnervación sinoaórtica (datos no mostrados).

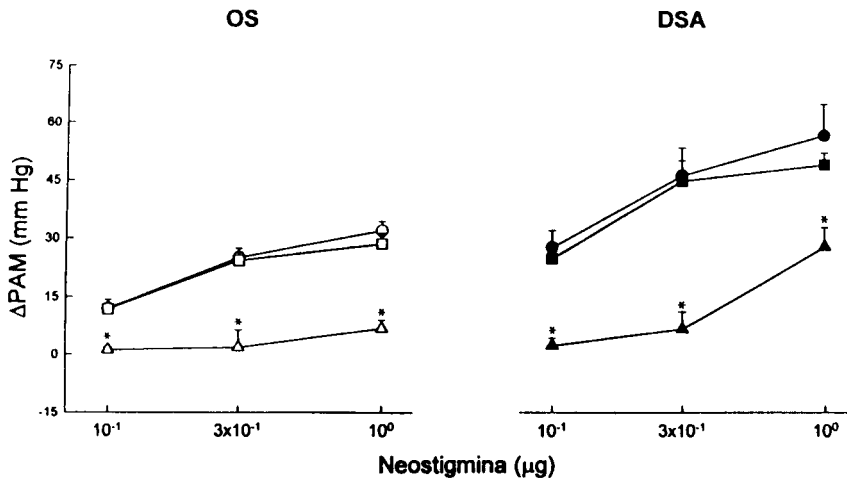


Figura 3. Efectos de la pirenzepina (0,3 nmol i.c.v.) y 4 DAMP (0,3 nmol i.c.v.) sobre los cambios de presión arterial media (PAM) inducidos por neostigmina (0,1 - 1 µg i.c.v.) en ratas con operación simulada (OS, símbolos blancos) y en animales con desnervación simulada (DSA, símbolos negros).

Los círculos representan las respuestas controles, los cuadrados las respuestas después de pirenzepina y los triángulos las respuestas después de 4-DAMP. Cada símbolo representa la media ± E.E.M. de cinco experimentos.

El componente entre grupos (análisis de la varianza) es significativo con $p < 0,01$ y $F_{(2,36)} = 60,035$ en las ratas con operación y con $p < 0,01$ y $F_{(2,36)} = 31,540$ en las ratas con desnervación sinoaórtica.

*al menos $p < 0,01$ comparado contra la respuesta control respectiva (test de "t" de Student no pareado).

DISCUSION

Siete días después de la desnervación sinoaórtica los valores basales de presión arterial media, calculados a partir del registro intraarterial de la presión sanguínea, fueron similares a aquellos de los animales controles con la operación simulada. Es sabido que la deaferentación de los barorreceptores solamente induce el incremento de la labilidad de la presión arterial pero no una hipertensión permanente ^{11,12}. Sin embargo, la evidencia existente sugiere que la deaferentación de los barorreceptores incrementa la actividad simpática periférica y afecta la respuesta cardiovascular a la inyección sistémica de agentes adrenérgicos ¹³⁻¹⁵.

Como fue reportado previamente ⁴, la administración intracerebroventricular de neostigmina induce un incremento de la presión arterial, siendo la respuesta presora mayor en las ratas con desnervación sinoaórtica que en los animales con operación simulada. La diferencia en la magnitud de la respuesta entre ambos grupos de ratas probablemente se deba a un cambio en la actividad neuronal de las vías colinérgicas del sistema nervioso central o a la abolición del mecanismo de regulación barorrefleja ⁴.

Esta respuesta presora a la estimulación colinérgica central estaría mediada por receptores muscarínicos del cerebro ^{1,3,4}. En estos últimos años, los receptores muscarínicos fueron subclasificados inicialmente en dos subtipos M₁ y M₂ ¹⁶, y posteriormente reclasificados en tres subtipos farmacológicos: M₁, M₂ y M₃ ^{7,16}. El receptor M₁ es bloqueado selectivamente por el antagonista pirenzepina, el M₂ por el bloqueante AF-DX116 y el M₃ por el 4-DAMP ^{7,16}, siendo los subtipos M₂ y M₃ equivalentes al subtipo M₂ de la primera subclasificación ^{7,16}.

Algunos autores han sugerido la participación de los receptores M₃ en los efectos cardiovasculares de la estimulación colinérgica central, mientras que otros sugieren la presencia de receptores M₁ en estos efectos ^{5,6,18}. De esta forma, surge el interés en estudiar el subtipo de receptor muscarínico involucrado en la mediación de los efectos cardiovasculares de la administración i.c.v. de neostigmina.

El antagonista selectivo 4-DAMP, pero no la pirenzepina, previno significativamente el efecto presor de la administración intracerebral del anticolinesterásico en las ratas con OS y en las DSA, sugiriendo, por lo tanto, una participación del receptor muscarínico M₃ en estos efectos centrales. Pazos *et al.* ¹⁸ también propusieron, pero utilizando solamente el antagonista selectivo M₁ pirenzepina y el muscarínico inespecífico escopolamina, que el efecto presor de la administración intracerebral de agonistas muscarínicos en la rata estaría al menos mediada parcialmente por el entonces subtipo M₂ de receptor muscarínico, actualmente subtipos M₂ y M₃. Otros autores reportaron, además, una participación de receptor muscarínico del entonces subtipo M₂ (actuales subtipos M₂ y M₃) en la respuesta presora a la administración endovenosa de fisostigmina, un anticolinesterásico terciario. Estos receptores estarían ubicados en el área presora medular ventrolateral ⁵. Sin embargo, Scheucher *et al.* ¹⁷ también comunicaron que la administración intracerebral del agonista muscarínico M₁ McN-A-343 producía un incremento de la presión arterial. De todas maneras, podría haber más de una vía colinérgica involucrada, como así también de estructuras cerebrales en los efectos de la estimulación colinérgica central por anticolinesterásicos ¹.

En conclusión, los resultados sugieren que los receptores muscarínicos involucrados en los efectos presores de la estimulación colinérgica por administración intracerebroventricular del anticolinesterásico neostigmina serían del subtipo M₃, tanto en las ratas con desnervación sinoaórtica como en los animales con un operación simulada.

Agradecimiento. El presente trabajo fue financiado mediante un subsidio otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brezenoff, H.E. & R. Giuliano (1982) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**: 341-381
2. Giuliano, R. & H.E. Brezenoff (1987) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **10**: 113-22
3. Taira, C.A. & M.A. Enero (1985) *Gen. Pharmacol.* **16**: 145-9
4. Taira, C.A. & M.A. Enero (1989) *European J. Pharmacol.* **159**: 265-72
5. Sundaram, K., A.J. Krieger & H. Sapru (1988) *Brain Res.* **449**: 141-9
6. Martin, J.R. (1992) *European J. Pharmacol.* **215**: 83-91
7. Askhenazi, A. & E.G. Peralta (1994) "Muscarinic Acetylcholine Receptors", en "*Handbook of Receptors and Channels*" (S.J. Peroutka, ed.), CRC Press, Boca Ratón, Florida, Vol. I, págs. 1-27
8. Krieger, E.M. (1964) *Circ. Res.* **15**: 511-21
9. De Groot, J. (1959) "*The Rat Forebrain in Stereotaxic Coordinates*", Amsterdam NV Nord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, pág. 24
10. Brunning, J.L. & B.L. Kintz (1977) "*Computational Handbook of Statistics*", 2º ed., Scott, Foresman and Company, Glenview, Illinois
11. Norman jr., R.A., T.G. Coleman & A.C. Dent (1981) *Hypertension* **3**: 119-25
12. Büchholz, R.A., J.W. Hubbard & M.A. Nathan (1986) *Hypertension* **8**: 1154-63
13. Alexander, N., J. McClaskey & R.F. Maronde (1976) *Life Sci.* **18**: 655-62
14. Alexander, N., M. Velásquez, M. De Cuir & R.F. Maronde (1980) *Am. J. Physiol.* **238**: H521-6
15. Taira, C.A. & M.A. Enero (1990) *Gen. Pharmacol.* **21**: 407-10
16. Eglen, R.M. & R.L. Whiting (1986) *J. Auton. Pharmac.* **5**: 323-46
17. Scheucher, A., C.J. Pirola, M.S. Balda, S.M. Dabsys, A.L. Alvarez, S. Finkielman & V.E. Nahmod (1987) *Neuropharmacology* **26**: 181-5
18. Pazos, A., K.H. Wiederhold & J.M. Palacios (1986) *European J. Pharmacol.* **125**: 63-70