

PILAR GONZALEZ LOPEZ

**ESTUDIO DE BUSCOPAN Y ALGINOR
EN FIBRA MUSCULAR LISA VASCULAR**

DIRECTOR: Prof. M.T. Tejerina Sánchez

Profesora Titular de Farmacología

Facultad de Medicina. UCM

CODIRECTOR: Prof. Juan Tamargo Menéndez

Catedrático de Farmacología

Facultad de Medicina. UCM

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

MAYO, 1993



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

Dña. MARIA TERESA TEJERINA SANCHEZ, Profesora Titular de Farmacología,
(Directora de la Tesis) y D. JUAN TAMARGO MENENDEZ, Catedrático de
Farmacología (Codirector) ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad
Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado: "ESTUDIO DE
BUSCOPAN Y ALGINOR EN FIBRA LISA VASCULAR" realizado por Dña. PILAR
GONZALEZ LOPEZ, ha sido llevado a cabo en este Departamento y bajo su
dirección, y consideran que reúne los requisitos necesarios para ser defendido
y optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en
Madrid a diez y siete de Mayo de mil novecientos noventa y tres.



DPTO. DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

D. PEDRO LORENZO FERNANDEZ, CATEDRATICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que considera favorablemente la admisión a trámite de la Tesis
Doctoral titulada: "ESTUDIO DE BUSCOPAN Y ALGINOR EN FIBRA LISA
VASCULAR" realizada por la Licenciada Dña. PILAR GONZALEZ LOPEZ,
dirigida por la Prof.Dra.Dña. M. Teresa Tejerina Sánchez (Profesora Titular de
este Departamento) y codirigida por el Prof.Dr.Don Juan Tamargo Menéndez
(Catedrático de este Departamento).

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente
en Madrid a diez y ocho de Mayo de mil novecientos noventa y tres.

A mis padres

A Javier

AGRADECIMIENTOS

No es posible pretender que un trabajo como el que viene a continuación sea sólo producto de la persona que lo defiende; esta Tesis es el resultado del esfuerzo, la dedicación y la ilusión de todos los que ahora quiero nombrar, a los que agradezco de todo corazón su colaboración para llevarla a buen fin. Así, mi agradecimiento:

A la Dra. M^a Teresa Tejerina, alma de esta Tesis, por su dirección, dedicación y amistad, sin cuya dirección, dedicación y amistad, sin cuyo esfuerzo ésto no hubiera sido posible.

Al Prof.Dr. Juan Tamargo, por su gran colaboración, sabios consejos y orientaciones. A ambos mi agradecimiento por haberme instruido en el mundo de la Farmacología y poder contarlos entre mis amigos.

Al Prof.Dr. Pedro Lorenzo Fernández, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis en su Departamento.

A los Dres. Javier López y Amalia Ubeda que compartieron mis experimentos, anhelos y amistad.

A las Licenciadas Teresa Chuliá y Marcela del Rio por su compañerismo, constante apoyo y su inestimable ayuda.

A las Dres. Carmen Valenzuela, Eva Delpón, Carmen Delgado, Francisco Pérez-Vizcaino y Juan José Díez por orientarme siempre que los necesité.

A los Dres. Fernando López, Ignacio Lizasoain y Juan Carlos Leza por su apoyo constante y los buenos ratos pasados.

A M^a Elena Vicente, Cristina Rivas y Manuel Lorenzo por su permanente solicitud para conmigo, y a todos los miembros del Departamento por su valiosa colaboración.

Al Laboratorio Behringer Ingelheim por haberme proporcionado generosamente el fármaco para la realización de esta Tesis.

A todos mi más sincera gratitud.

I N D I C E

INTRODUCCION

1. Buscopan	12
1.1. Generalidades	12
1.2. Estructura Química	12
1.3. Farmacocinética	13
1.4. Acciones farmacológicas	13
1.5. Toxicidad	14
1.6. Tolerancia	16
1.6.1. Dosificación y efectos secundarios..	17
1.7. Indicaciones clínicas	18
1.7.1. Aparato gastrointestinal	18
1.7.2. Vías biliares y urinarias	19
1.7.3. Aparato genital femenino	19
2. Alginor	20
2.1. Estructura Química	21
2.2. Farmacocinética y Metabolismo	22
2.3. Tolerancia local	23
2.4. Toxicidad	24
2.4.1. Toxicidad aguda	24
2.4.2. Toxicidad subaguda en la rata	24
2.4.3. Toxicidad crónica en rata	24
2.4.4. Toxicidad crónica de perro "beagle".	25
2.4.5. Efecto teratógeno en rata y conejo .	25

2.5. Acciones del alginor	25
2.5.1. Actividad antiespasmódica pre- clínica	26
2.5.2. Actividad antiulcerosa y anti- secretora	27
2.5.3. Actividad sobre la motilidad intestinal	27
2.5.4. Actividad antisialílica, midriásica y gangliopléjica	27
2.5.5. Actividad sobre el aparato cardio- vascular	28
2.5.6. Actividad antiespasmódica clínica ..	28
2.5.7. Otras acciones farmacológicas	29
2.5.8. Actividad sobre la fibra muscular lisa según la vía de adminis- tración utilizada	30
2.6. Tolerancia clínica del Alginor	32
3. Mecanismo de acción de Buscopán y Alginor	34
4. Mecanismos básicos de la homeostasis del calcio celular	45
4.1. Mecanismo de entrada del Ca en las células .	46
4.2. Movimientos de calcio hacia el exterior de la célula	48
4.3. Papel del calcio en las fibras musculares lisas vasculares	48

4.4. Entrada de calcio extracelular	50
4.4.1. Despolarización de la membrana	50
4.4.2. Acoplamiento excitación-contracción .	52
4.4.3. Mecanismos de regulación de la interacción actina-miosina	53
4.4.4. Canales de entrada de calcio	54
4.4.4.1. Canales activados por voltaje (VOCs)	56
4.4.4.2. Canales activados por agonistas (ROCS).....	64
4.4.4.3. Importancia de la entrada de calcio en la respuesta celular	69
5. Participación del endotelio en la relajación vascular	71
5.1. Naturaleza química del factor endotelial (EDFR)	73
5.2. Trascendencia fisiológica y farmacológica ..	75
 MATERIAL Y METODOS	
1. Estudios en aorta de conejo	79
1.1. Procedimiento experimental	79
1.2. Mantenimiento de las preparaciones	80
1.3. Sistema de registro	82
2. Diseños experimentales	82

2.1. Anillos de aorta	82
3. Determinación de los flujos de ⁴⁵ Ca en anillos de aorta	87
3.1. Justificación de los métodos	87
3.2. Determinación de la radioactividad	90
3.3. Determinación del flujo de entrada de ⁴⁵ Ca .	93
3.4. Preparaciones de las aortas para el conteo radiactivo	94
3.5. Líquido de centelleo	95
3.6. Técnica de medida de la radioactividad	96
3.7. Cálculo del flujo de entrada de ⁴⁵ Ca	96
4. Fármacos y productos químicos utilizados	97
4.1. Líquidos nutricios	97
4.2. Fármacos utilizados	98
4.3. Productos utilizados en las determinaciones de los flujos de ⁴⁵ Ca	98
4.3.1. Productos radiactivos	98
4.3.2. Productos necesarios para la preparación del líquido de centelleo	99
4.3.3. Productos necesarios para la preparación de las muestras radioactivas	99
5. Análisis estadístico	99

RESULTADOS

1. Experimentos en medio con calcio	101
1.1. Efectos de Buscopán y Alginor sobre las contracciones inducidas por potasio	101
1.2. Efectos del Buscopán y Alginor sobre las contracciones inducidas por NA	104
1.3. Capacidad de Buscopán y Alginor para relajar las contracciones inducidas por KCl	109
1.4. Capacidad de Buscopán y Alginor para relajar las contracciones inducidas por NA .	113
1.5. Capacidad de Alginor para relajar las contracciones inducidas por KCl y NA	117
1.6. Efectos de Buscopán y Alginor sobre la tensión basal	119
2. Experimentos en un medio exento de calcio	119
2.1. Efectos del Alginor en aorta despolarizada .	123
2.2. Estudio de los posibles efectos intracelu- lares de Buscopán y Alginor sobre las con- tracciones producidas por NA	125
2.3. Efectos del Alginor sobre las contracciones inducidas por KCl en aortas desprovistas de endotelio	129
3. Determinación de los flujos de calcio	136
3.1. Acción de Buscopán sobre la entrada de ⁴⁵ Ca	136
3.1.1. Estimuladas por KCl	136

3.1.2. Estimuladas por Na.....	136
3.2. Acción del alginor sobre la entrada de ⁴⁵ Ca....	138
3.2.1. Em condiciones basales.....	138
3.2.2. Estimulados por KCl.....	138
3.2.3. Estimulados por Na.....	141
DISCUSION.....	143
CONCLUSINES.....	157
BIBLIOGRAFIA.....	160

HIPOTESIS DE TRABAJO

El objeto de esta Tesis Doctoral fue analizar y comparar el posible mecanismo de acción de buscopán y alginor a nivel de la fibra muscular lisa vascular. Como es conocido, los niveles de calcio libres en citosol regulan la actividad contráctil de la musculatura lisa.

Por todo ello, nos pareció interesante tratar de elucidar el posible mecanismo de acción relajante muscular de estos dos fármacos a nivel de los lechos vasculares. Para ello, realizamos el montaje de las preparaciones de aorta torácica de conejo en anillos. Además, debido a la gran importancia que en los últimos tiempos ha adquirido el endotelio por su capacidad moduladora del tono vascular, utilizamos las mismas preparaciones a las que previamente se les había desprovisto de endotelio.

Con dichas preparaciones experimentales se han realizado los estudios de contractilidad para determinar la acción de los fármacos sobre la entrada de Ca y también su mecanismo de acción a nivel del Ca intracelular, mediante la aplicación de protocolos experimentales específicos donde el agonista utilizado era noradrenalina. Sin embargo, los resultados obtenidos con estos estudios sólo permitieron hacer deducciones indirectas de los movimientos del Ca, por lo que se realizaron determinaciones más directas de estos flujos mediante experimentos con ^{45}Ca y determinaciones de AMPc.

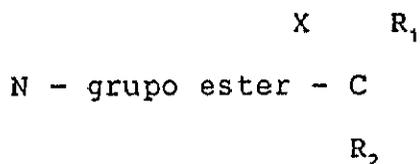
Las investigaciones realizadas por nosotros nos han permitido profundizar en el mecanismo íntimo de la acción relajante muscular de dos fármacos muy empleados en la clínica diaria.

INTRODUCCION

En un intento de obtener fármacos con una acción relajante más específica y selectiva que la atropina y la hioscina, especialmente sobre el aparato gastrointestinal, se han sintetizado numerosos derivados de los alcaloides naturales.

Los alcaloides derivados de la familia de las solanáceas disminuyen la secreción gástrica solamente a dosis terapéuticas muy elevadas y, a pesar de que algunos autores (HARMMER y GIACHETTI, 1984) afirman lo contrario, sólo unos pocos de los compuestos sintéticos han demostrado ser manifiestamente mejores. Lo mejor que se puede decir de los compuestos sintéticos más activos, es que permiten una dieta menos rígida y que el tratamiento antiácido resulta más eficaz. Pero estos compuestos siguen presentando importantes reacciones adversas, tales como sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento y dificultad en la micción. Aunque estos compuestos sean poco utilizados en la úlcera péptica, muchos fármacos tipo atropina resultan eficaces como antiespasmódicos y se utilizan para prevenir y tratar espasmos, hipermotilidad y cólicos del intestino y del tracto urogenital.

Algunos son utilizados por su acción midriática, que es relativamente de corta duración y por este motivo es poco probable que produzcan un aumento importante de la presión intraocular. La mayor parte de los fármacos tipo-atropina poseen la estructura general que se indica a continuación (figura 1)



en la que

- R_1 es un grupo arilo de tipo fenílico o policíclico.
- R_2 , puede variar de tamaño desde un hidroximetil a ciclohexil y fenil
- X, puede ser -H, -OH, -CN, $-\text{CO}_2\text{R}$, CONH_2 ó un alquilo (BOWMAN y RAND, 1984).

Tanto N-butil-bromuro de hioscina (Buscopan) como N-ciclopropilmetil-bromuro de hioscina (alginor) son compuestos que presentan un amonio cuaternario, siendo derivados cuaternizados de los alcaloides naturales.

En general, la cuaternización de un compuesto tipo atropina aumenta la actividad antimuscarínica sobre el intestino, por lo aumentan los efectos colaterales y se disminuye la acción antiespasmódica tipo papaverina. La cuaternización también confiere al compuesto actividad bloqueante ganglionar, lo que contribuye a su acción anti-espasmódica sobre el intestino; con algunos de estos compuestos se puede conseguir una cierta inhibición de la secreción ácida sin efectos colaterales importantes.

1. BUSCOPAN

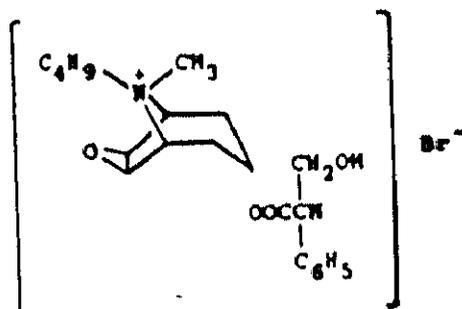
1.1. GENERALIDADES

El amplio uso terapéutico de los fármacos antimuscarínicos, estimuló hace ya varias décadas la síntesis de numerosos derivados de las solanáceas con el deseo de mejorar las acciones beneficiosas de éstos compuestos y disminuir la incidencia de reacciones adversas.

Fruto de estas investigaciones nació una molécula nueva, el buscopán (HEINKEL, 1951; BENITO y GONZALEZ, 1953) que por su excelente tolerancia y la escasa presencia de efectos secundarios, logró imponerse en la clínica diaria con muy buenos resultados y que es uno de los fármacos más utilizado en tres situaciones clínicas, donde su acción relajante de la fibra muscular lisa es capaz de inhibir uno de los síntomas más temidos: el dolor.

1.2. ESTRUCTURA QUIMICA.

El buscopán ó N-butil bromuro de hioscina ((-) -(1S,3s,-5R,7S)-8- Butyl-6-7-epoxy-3-3 [(S)-Tropoyloxy] Tropanium bromide), tiene un Pm de 440,4 daltons y es un alcaloide de constitución química parecida a la atropina (GOODMAN y cols. 1991) (figura 2).



Se presenta en forma de polvo blanco, de sabor amargo, disolviéndose 1 g en 1 cc de agua destilada a 20°C (Index Merck).

1.3. FARMACOCINETICA.

Como todos los fármacos cuaternarios presenta una escasa absorción por vía oral (JONKMAN y cols. 1977) y no atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria, por lo que está exento de acciones a nivel central y sobre el feto.

Después de la administración intravenosa de 8 mg, se elimina el 42% y 37% por orina y heces, respectivamente (HELLSTRÖM y cols., 1979; WAHL, 1975).

1.4. ACCIONES FARMACOLOGICAS.

La relación existente entre los principales efectos del fármaco (determinados al evaluar su acción espasmolítica en el intestino aislado tratado con pilocarpina), y los efectos secundarios (evaluados determinando la midriasis que produce en el ratón blanco), permiten comparar las acciones del buscopán con las de escopolamina y atropina (tabla I). Si se considera que la potencia de atropina es de 1, es evidente que el intervalo de dosis existente entre la que produce el efecto farmacológico y la que induce la aparición de efectos secundarios es amplio, lo que hace que buscopán presente un amplio margen terapéutico.

En la tabla I se refleja una décima parte de la acción correspondiente, respecto a la atropina y escopolamina. La acción de buscopán en pruebas realizadas en animales, demostraron una acción antinicotínica 25 veces superior a la escopolamina.

Todas las investigaciones farmacológicas evidencian que buscopán no bloquea las acciones muscarínicas producidas por acetilcolina, pero sí la acción estimulante ganglionar como ocurre con nicotina (HERXHEIMER y HAEFELI, 1966)

TABLA I

	EFEECTO PRINCIPAL	EFEECTO SECUNDARIO
Atropina	1	1
Escopolamina	1	2,5
Buscopán	0,51	0,002

(Tomada de Stockhaus y Wick, 1969)

1.5. TOXICIDAD.

Los estudios toxicológicos se realizaron en diversa especies animales, tras la administración de buscopan por vía oral, intravenosa o subcutánea.

Los estudios de toxicidad subaguda (1 mes) y toxicidad crónica (3 meses), se han realizado tras la administración

del fármaco por vía oral en perros y ratas, y los de toxicidad crónica en ratas, cobayos y perros. Estas pruebas incluyeron estudios analíticos, hematológicos y urinarios, pruebas de función hepática, estudios histopatológicos y la evaluación de sus efectos teratogénicos, en cobayas preñadas, encontrándose en todas ellas que el fármaco no producía cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados (STOCKHAUS y WICK, 1969; FERRARI, 1973; BERLE, 1974).

En experimentos realizados en ratones blancos, apareció un efecto sedante a nivel del SNC, que no se observó en presencia de escopolamina (BAUER y cols. 1968). El fármaco no producía cambios a nivel de presión arterial, glucemia y frecuencia respiratoria cuando se administraba en el tratamiento de pancreatitis aguda producida de forma experimental (HEINKEL y CARVALHO, 1959).

Por vía subcutánea la dosis letal del buscopán en el ratón blanco es de 300 mg/kg aproximadamente, es decir tres veces inferior a la correspondiente dosis de atropina. Por vía oral, la dosis letal del buscopán es de con 3000 mg/kg, es decir, buscopán presenta una toxicidad muy inferior a la de la atropina (BERLE, 1974). Con respecto a atropina, la tabla I refleja una acción superior de escopolamina, pero inferior a buscopán (BAUER y cols. 1968).

1.6. TOLERANCIA.

El buscopán, aparece dentro de las drogas con propiedades espasmolíticas, como un fármaco de muy buena tolerancia.

Utilizado por vía oral, a dosis de 30 mg ó 50 mg/6 h, por vía subcutánea a dosis de 30 mg, por vía intravenosa a dosis de 20-25 mg y por vía intramuscular a dosis de 20 mg/8 h, todos los estudios, tanto experimentales como clínicos, coinciden en afirmar que la tolerancia al fármaco por parte del paciente es excelente (WAHL, 1975; HELLSTROM y cols. 1979; GOETZKE y MONNERGAHM, 1983), no apareciendo efectos secundarios a las dosis utilizadas y siendo éstos poco valorables tras la utilización de grandes dosis de buscopán (BAUER y cols. 1968). La buena tolerancia del fármaco queda puesta de manifiesto, ya que los pacientes no comentan, de forma espontánea, ni al preguntarles, los efectos indeseables que aparecen con atropina y escopolamina (disminución del sudor, alteraciones en la visión, sequedad de boca, mareo, taquicardia y midriasis). Tampoco aparecen efectos acumulativos ni taquifilaxia o tolerancia cuando se administra de forma crónica (MÖLLER y ROSEN, 1968). En ningún caso se ha observado la presencia de atonía esofágica, un efecto indeseable que puede aparecer con atropina (WALDRAM y cols. 1977).

Algun autor describe la aparición de un discreto aumento

de la Presión arterial y un ligero incremento de la frecuencia cardíaca (100-120 lat/min) que no duraban más de 30 min, cuando se utilizaba la vía intravenosa, pero por esta vía no se observaba atonía intestinal ni siquiera cuando se utilizaban grandes dosis (SCHMID y cols. 1968).

En un estudio realizado en 93 pacientes, se concluye que dentro de los farmacos espasmolíticos el buscopan tiene un efectividad similar a la de las preparaciones de la Belladona (atropina) pero presenta ventajas sobre estos y sobre la escopolamina, ya que apenas presenta efecto secundario o estos son muy ligeros, y debido al amplio rango terapéutico que el fármaco presenta es posible ajustar la dosis de forma individual (MIYOSHI y cols. 1977).

1.6.1. Dosificación y efectos secundarios.

Los estudios experimentales se realizaron en ratas para determinar la relación entre la dosis administrada y la aparición de los efectos secundarios sobre la acomodación ocular, glándulas salivares y frecuencia cardíaca, demostrando la casi ausencia de efectos secundarios, en comparación con la atropina que produce parálisis de la acomodación, inhibe la salivación y aumenta la frecuencia cardíaca (VAPAATALO y cols. 1972; PENTIKAINEN y cols. 1973).

Las pruebas realizadas en estudios clínicos nos demues-

tran que el buscopán presenta, cuando se compara con atropina o con otros espasmolíticos, como ventaja real una escasa aparición de efectos indeseables, debido a su excelente tolerancia, como lo demuestran diferentes estudios en voluntarios y animales (WALDECK, 1969; WAHL, 1975,1977; GOETZKE Y MONNERJAHN, 1983).

1.7. INDICACIONES CLINICAS.

Por los resultados obtenidos, el buscopán se presenta como un fármaco uniforme y positivo, en cuanto a su utilización. Debido a su efecto relajante muscular, puede ser utilizado en todas aquellas ocasiones donde sea necesario relajar la fibra muscular lisa (FML) (HEINKEL, 1951; WALDRAM y cols. 1977) tal como ocurre a nivel de:

1.7.1. Aparato gastrointestinal.

Se utiliza en el tratamiento de cólicos intestinales, estreñimiento espástico y vómitos postoperatorios (GUIGNARD y cols. 1968; SOLANKE, 1969; SIEG, 1974; DESHPANDE, 1976; BAUER, 1987) y en pruebas diagnósticas (endoscopia, doble contraste) realizadas para detectar patología a nivel de este aparato (SOLANKE, 1969; WALDRAM y cols. 1977; LEE, 1982; HUPSCHER, 1984; STEGER y cols. 1986). Su papel en el trata

miento del ulcus gastrico y duodenal se ha visto relegado en los ultimos años coincidiendo con la aparición de los antihistaminicos H₂ y del omeprazol.

1.7.2. Vías biliares y urinarias.

Es útil en procesos de las vías biliares que cursan con espasmos y discinesia, tales como: colecistitis, colangitis, colelitiásis, síndrome post-colicestectomía (DESHPANDE, 1976). A nivel de las vías urinarias, ha demostrado su efectividad en cuadros de urolitiasis, tenesmo vesical e irritación mecánica postquirúrgica.

1.7.3. Aparato genital femenino.

En comparación con otros espasmolíticos, el buscopán presenta la ventaja de que no produce efectos indeseables para la madre o el feto, lo que permite su utilización a dosis superiores a 0,02 g, durante el periodo de dilatación en el parto (FUENTE, 1980), a la vez que facilita el alumbramiento, al ser más efectivas las contracciones, también puede utilizarse en patologías ginecológicas que cursan con dismenorrea y en los espasmos a nivel de éste aparato (HEINKEL, 1951).

2. ALGINOR (DA 3177)

El alginor ó N-ciclopromilmetil bromuro de escopolamina (DA 3177), pertenece a una serie de sales cuaternarias de la escopolamina .

El estudio de este fármaco, sintetizado por CASADIO y DONETTI en 1974, se ha basado en la hipótesis de que la cuaternización de los derivados del tropano con radicales semirrígidos -como son las estructuras de anillo pequeño o estructuras prenílicas- pudiera permitir un mejor acoplamiento con los receptores muscarínicos. Es conocido que la metilescopolamina, cuyo radical cuaternizante es un grupo metílico, desarrolla principalmente una actividad antisecretora, mientras que la butilescopolamina, cuyo radical cuaternizante es una cadena lineal de 4 átomos de carbono - (R = (CH₂)₃ - CH₃, desarrolla una menor actividad antisecretora y actividad antiespasmódica.

El alginor es el resultado de un análisis dirigido a la obtención de fármacos con mayor actividad anticolinérgica y antiespasmódica (SCHIAVONE y cols. 1985). Este nuevo fármaco presenta un índice terapéutico más favorable que el buscopán, el antiespasmódico más conocido (FABBRO y cols. 1977; LITTA-MODIGNARI y cols. 1977, 1978; SCHIAVONE y cols. 1985). El alginor es un fármaco que presenta una potente actividad parasimpaticolítica aún a dosis bajas y presenta un amplio

margen de seguridad, apareciendo reacciones adversas en un pequeño porcentaje de casos tratados (PIAI y cols. 1986; SCARPIGNATO y cols. 1988). Además, el medicamento puede ser administrado repetidamente sin producir fenómenos de tolerancia (LITTA-MODIGNARI y cols. 1978).

TABLA II.- IC_{50} (nM) y 95% límites de confianza para alginor y atropina frente a distintos agentes espasmógenos (Tomada de Schiavone y cols. 1985).

ESPASMO	ALGINOR	ATROPINA
Acetilcolina	0.079 (0.066-0.096)	0.037 (0.032-0.046)
Serotonina	0.13 (0.07-0.23)	51.5 (25.8-107.9)
Histamina	> 100	74.5 (55.8-99.0)
BaCl ₂	3.0 (2.0-4.4)	0.18 (0.11-0.3)

2.1. ESTRUCTURA QUIMICA.

Alginor es el N - ciclopropilmetil-bromuro de escopolamina (3-oxo-9-azoniatriciclo [3.3.1.0^{2,4}] nonano-9-(ciclopropilmetil)-7-(3-hidroxi-1-oxo-2-fenilpropoxi-9-metil-bromuro, [7(S)-(1 α , 2B, 4B-5 α , 7B) , (figura 3):

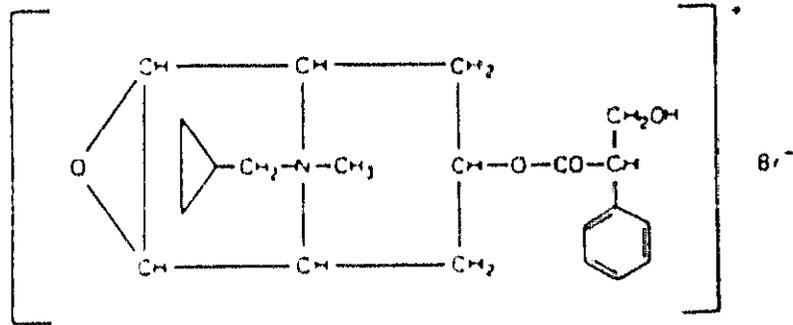


Figura 3

2.2. FARMACOCINETICA Y METABOLISMO.

La mayoría de los estudios en animales proceden del Departamento de Investigación del Instituto De Angeli en Milan.

Por vía oral, su absorción es pobre (1-4%), pero presenta una vida media larga, por lo que se acumula en hígado, intestino y riñón (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985). Estudios recientes en células hepáticas de distintas especies animales (rata, hamster, ratón y cobayo) (KAJBAF y cols. 1991; KAJBAF y cols. 1992) han identificado, por técnicas de espectrometría (HPLC), la presencia de distintos metabolitos en orina (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , M_7), que varían según la especie animal, predominando en la rata, ratón y cobayo el tipo M_7 , estos metabolitos se eliminan por vía urinaria y biliar (DANIOTTI y cols. 1986).

A dosis de 5-10 mg por vía intramuscular presenta una elevada actividad antiespasmódica, siendo bien tolerados hasta dosis de hasta 40 mg (RESIDORI y cols. 1978). Por vía parenteral, los efectos de alginor aparecen de forma rápida, observándose al cabo de 10 min una marcada reducción de hasta un 60 % en la sintomatología dolorosa (60%) (SPIVACH y cols. 1977).

Las principales ventajas de esta nueva molécula son:

- Su rapidez de acción, particularmente evidente por vía parenteral, en la eliminación de la sintomatología dolorosa debido a espasmos de la musculatura lisa en comparación con buscopán (SPIVACH y cols. 1977; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985), donde la dosis utilizada es mayor (por vía intravenosa 5 mg alginor y 20 mg buscopán producen similares efectos) y otros agentes cuaternarios (BONZI y cols. 1979; PIAI y cols. 1986; FORNAPIERO, 1990).

La duración de la acción del alginor es evidente y apreciable en maniobras exploratorias que requieren la atonía de la víscera; así, es frecuente realizar una premedicación preendoscópica combinando alginor y diazepam (0-5 mg/kg) (COOK y cols. 1984; PARENTE y cols. 1985; PANDOLFO y cols. 1990).

2.3. TOLERANCIA LOCAL.

El medicamento presenta una excelente tolerancia en ratón, rata, conejo y perro (MARAZZI-UBERTI, 1973).

2.4. TOXICIDAD.

2.4.1. Toxicidad aguda.

EL alginor presenta una escasa toxicidad aguda, siendo inferior a la de la butilescopolamina en todas las especies animales y por cualquiera de las vías de administración empleadas (MARAZZI-UBERTI, 1973; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.4.2. Toxicidad subaguda en la rata.

El alginor, administrado a ratas por vía intramuscular y por vía oral durante 21 días seguidos, en dosis crecientes de 100 a 400 veces más elevadas que las habitualmente prescritas en clínica, ha sido bien tolerada tanto desde el punto de vista morfológico como funcional (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.4.3. Toxicidad crónica en rata.

Administrado durante 11 semanas seguidas por vía oral e intramuscular, el alginor no ha provocado ningún efecto tóxico ya sea desde el punto de vista morfológico o funcional. Tampoco se han observado efectos mutagénicos o carcino

genéticos atribuibles al fármaco cuando se administra de forma más prolongada (MARAZZI-UBERTI, 1973; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.4.4. Toxicidad crónica en perro "beagle".

Utilizando las vías citadas en los apartados anteriores, durante 26 semanas seguidas, y a dosis más elevadas que las terapéuticas, el alginor no produce lesiones morfológicas o histológicas a nivel de distintos parenquimas ni en los órganos hematopoyéticos (MARAZZI-UBERTI, 1973; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.4.5. Efecto teratógeno en rata y conejo.

El estudio de los posibles efectos teratógenos del alginor ha sido realizado con ratas y conejas preñadas.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento es bien tolerado a todas las dosis empleadas y que el fármaco no produce malformación alguna en los distintos órganos y aparatos de los animales recién nacidos (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.5. ACCIONES DEL ALGINOR.

El alginor es un compuesto que bloquea de forma competitiva los receptores muscarínicos de la musculatura lisa y

presenta propiedades espasmolíticas. Debido a su baja incidencia de reacciones adversas tipo-atropina ha sido utilizado en el tratamiento de cuadros clínicos que cursan con espasmo de la musculatura gastrointestinal, biliar y del tracto uro-genital, así como medicación pre-endoscópica (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985; FORNAPIERO y cols. 1990; JUNG y cols. 1992).

En los siguientes apartados analizaremos su actividad relajante muscular desde el punto de vista experimental y clínico (IMBIMBO y cols. 1986; SAGRADA y cols., 1989).

2.5.1. Actividad antiespasmódica preclínica.

El alginor desarrolla "in vitro" e "in vivo" una eficaz acción antiespasmódica a dosis mínimas. La actividad anti-espasmódica del producto es muy elevada a dosis de 3-40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía endovenosa o de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intramuscular en gatos, conejos y perros y de 3 mg/kg por vía oral y rectal en el perro (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

Con respecto al alginor, los órganos más receptivos a su acción son el tracto gastroentérico y las vías biliares (LITTA-MODIGNARI y cols., 1977/1978; FABBRO y cols. 1977; POZO y cols. 1990), siendo su acción similar a la del buscopán (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.5.2. Actividad antiulcerosa y antisecretora.

La actividad antiulcerosa y antisecretora del alginor se manifiesta en dosis mucho más elevadas que aquellas empleadas para lograr el efecto antiespasmódico. Su eficacia es igual a la de la butilescopolamina (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

Estos estudios demuestran que los anticolinérgicos y el alginor (LONDONG, 1982) son muy útiles para reducir el estado espástico de la musculatura gástrica, a menudo asociado a la lesión ulcerosa en humanos (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985; SCARPIGNATO y cols. 1985; NISHIWAKY y cols, 1989; JUNG y cols, 1992).

2.5.3. Actividad sobre la motilidad intestinal.

El alginor manifiesta su máxima actividad antiespasmódica en dosis que no modifican el normal peristaltismo intestinal, por lo que puede utilizarse en el síndrome del colon irritable (FABRO y cols. 1977; RESIDORI y cols. 1978; PIAI y cols., 1986; LANFRANCHI y cols. 1988; SCHIAVONE y cols. 1989; GUSLANDI, 1990).

2.5.4. Actividad antisialílica, midriásica y gangliopléjica.

La actividad antisialílica se manifiesta a dosis muy elevadas y es inferior a la de la butilescopolamina (LITTA-

MODIGNARI y cols. 1977/78; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

La actividad midriásica, en conjunto, es parecida a la de la butilescopolamina, variando según las especies (ratas y perros) y la vía de administración (FABBRO y cols. 1977).

A dosis muy elevadas se manifiesta su acción gangliopléjica, que no difiere con respecto a la butilescopolamina (RESIDORI y cols. 1978).

2.5.5. Actividad sobre el aparato cardiovascular.

En rata, perro y conejo, el alginor no modifica la presión arterial e inhibe las respuestas hipotensoras producidas por la inyección de fármacos parasimpaticomiméticos o tras la estimulación vagal, siendo su potencia a similar a la de la butilescopolamina (LITTA-MODIGNARI, 1977-78; RESIDORI y cols, 1977; MANGANELLI y ACCONCIA, 1977; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985).

2.5.6. Actividad antiespasmódica clínica.

La actividad antiespasmódica que presentan las diversas formulaciones de alginor ha sido estudiada en numerosos trabajos clínicos .

La mayoría de estos trabajos han sido realizados en condiciones doble ciego, versus placebo y comparativos con

el maleato de trimebutina- (TMB), el N-butilbromuro de escopolamina (buscopán), el clorhidrato de ciclodolamina (DC), en pacientes con procesos de tipo espástico y doloroso, que afectaban a los aparatos gastro-entérico, hepato-biliar y genito-urinario (LITTA-MODIGNARI y cols, 1987/1978; ACCINELLI y cols., 1978; DANIOTTI y cols., 1986; RESIDORI y cols., 1978; FRIGERIO y cols., 1986; PARENTE y cols., 1985; FIORELLI y cols., 1986; PIAI y cols., 1986; FORNAPIERO y cols. 1990; JUNG y cols., 1992).

2.5.7. Otras acciones farmacológicas.

En el conejo anestesiado la administración i.v. rápida de alginor, a dosis superiores a las de butilescolamina y mucho más elevadas que aquellas necesarias para desarrollar el efecto antiespasmódico, produce una depresión de la respiración e incluso apnea (MARAZZI-UBERTI, 1973) el alginor no presenta propiedades anticonvulsivantes, no aumenta el tiempo de sueño inducido por barbitúricos, al contrario que la butilescolamina. No inhibe los temblores causados por la temorina. Todo ello demuestra la ausencia de efectos centrales del fármaco. Asimismo, carece de cualquier actividad analgésica ó anestésico-local, no presentando efecto sobre la temperatura corpórea.

Tampoco produce cambios sobre la diuresis, coleresis, glucemia o el tiempo de coagulación (tiempo de Quick) (INSTITUTO DE ANGELI, 1973).

2.5.8. Actividad sobre la fibra muscular lisa según la vía de administración utilizada.

a) Por vía oral, el alginor, a las dosis de 150-300 mg/día tiene un efecto terapéutico en el tratamiento sintomático de formas morbosas caracterizadas por un componente espástico o discinético; posteriormente, dosis de 150-200 mg/día son suficientes para mantener el efecto logrado y evitar las recaídas (SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985; SCHIAVONE y cols., 1989).

b) Inyectado por vía i.v. (ampollas de 5 mg), es eficaz para suprimir estados espástico-dolorosos a nivel de vías urinarias (MANGANELLI y ACCONCIA, 1977; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985). En cólicos hepáticos y renales, se utiliza por vía i.m. o i.v. a la dosis de 5 mg. Sin embargo, dosis de 10-20 mg son perfectamente toleradas por el paciente (SPIVACH y cols. 1977; FABBRO y cols. 1977; RESIDORI y cols. 1978; LITTA-MODIGNARI, 1978; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985). Esta actividad antiespasmódica resultó ser al menos similar a la del buscopán en ampollas por vía i.v. de 20 mg, medicamento eficaz y muy empleado en clínica (FABBRO y cols. 1977; FORNAPIERO, 1990).

c) Por vía rectal, el alginor (en supositorios de 25 y 50 mg) ha sido ensayado en comparación con placebo y con el maleato de trimebutin en supositorios de 100 mg. La dosis, de alginor, 100 mg/día, resultó ser la óptima para un tratamien-

to eficaz de los trastornos del tracto gastrointestinal de tipo espástico-discinético (RESIDORI y cols., 1978; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985; JUNG y cols., 1992).

d) Administrado en fleboclisis, produce relajación del cuello uterino reduciendo durante el periodo de dilatación la espasticidad del cuello uterino, con la consiguiente disminución del tono muscular (ACCINELLI y cols. 1978; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985). En comparación con buscopan es más activo , siendo perfecta su tolerancia a nivel materno y fetal, por lo que resulta ventajoso durante el parto.

e) Asimismo, en exploraciones endoscópicas y radiológicas donde se requiere una atonía de la musculatura lisa, se ha demostrado que el alginores eficaz y bien tolerado durante todo el periodo del exámen, (HOFKIN, 1969; DUNN y cols. 1970; COOK y cols. 1984; SCARPIGNATO y BIANCHI-PORRO, 1985). Su actividad antiespasmódica, en estas circunstancias, resultó ser 3.5 veces más elevada que buscopán utilizado como fármaco de comparación (PARENTE y cols. 1985).

f) En pediatría se utilizó la presentación farmacéutica en gotas, desarrollándose una eficaz actividad antiespástica en dosis desprovistas de reacciones adversas, en particular de tipo atropínico para el tratamiento de niños afectos de vómitos espásticos-discinéticos. La ausencia de efectos colaterales es muy importante en el niño, que es más sensible

a los efectos atropínicos con respecto al adulto. En estas situaciones el alginor ha demostrado ser mas eficaz que el clorhidrato de diclomina.

2.6. TOLERANCIA CLINICA DEL ALGINOR.

La tolerancia de este fármaco es excelente, apreciándose escasas reacciones adversas; la más significativa, en comparación con el buscopán, la xerostomía que aparece por via intramuscular a dosis de 10-20 mg (SPIVACH y cols, 1977). Por tanto, alginor constituye un fármaco eficaz para eliminar los espasmos o inhibir la motilidad de la musculatura lisa del aparato gastrointestinal, vías biliares y urinarias (IMBIMBO y cols. 1990; SPIVACH y cols, 1977; SCARPIGNATO y cols. 1985b; MANGANELLI y ACCONCIA, 1977); además de ser una ventaja real durante el parto al ser más activo que los antiespásticos empleados comúnmente y su buena tolerancia materno-fetal (ACCINELLI y cols. 1978). Es un eficaz tratamiento de la patología del vómito espástico-discinético del aparato digestivo del niño y del adulto y en el síndrome de colon irritable (PASSARETTI y cols. 1989). En estos síndromes el alginor inhibe de forma significativa (figura 4) tanto el dolor abdominal a la palpación como el meteorismo con ausencia de efectos secundarios indeseables a las dosis utilizadas.

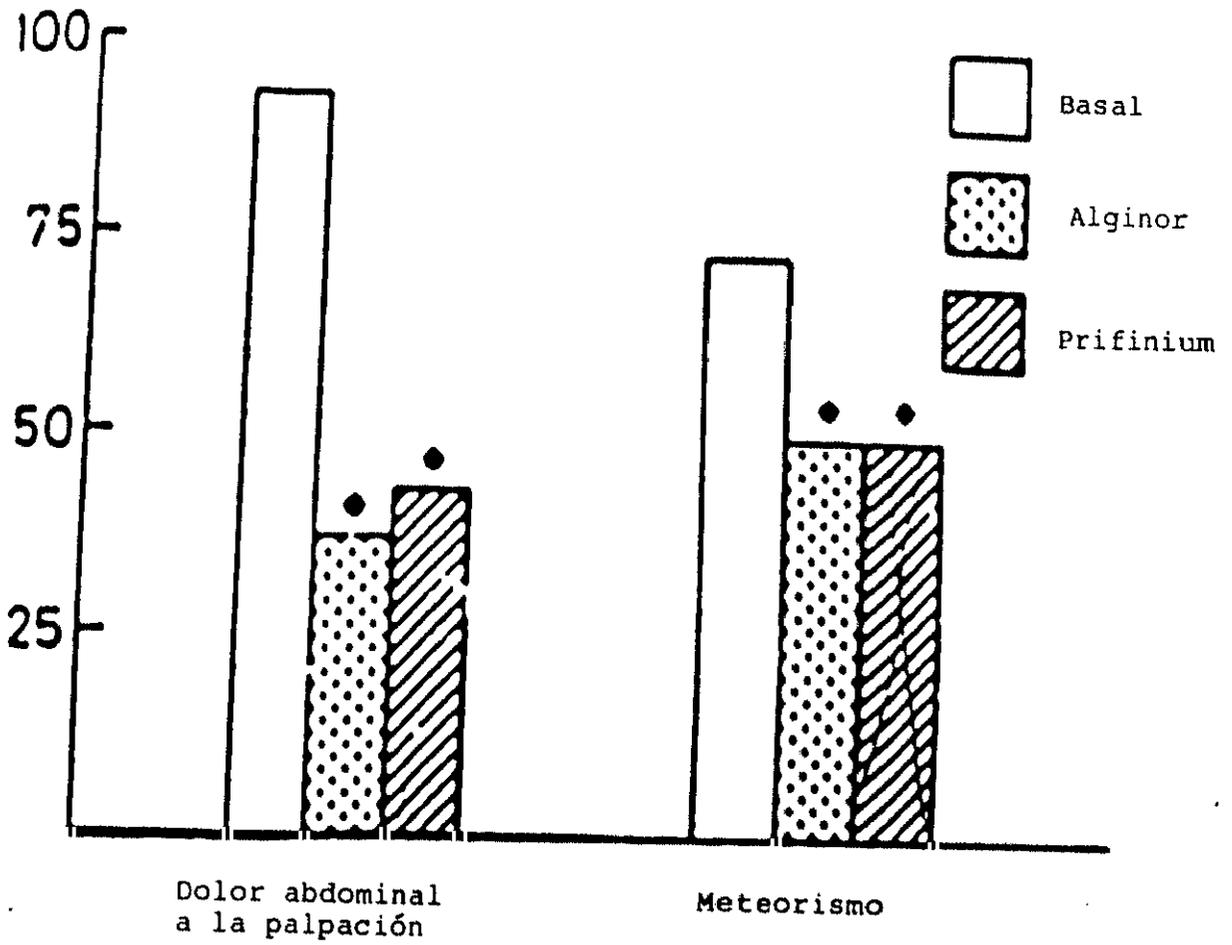


Figura 4.- Modificaciones en los signos físicos tras el tratamiento con Alginor y Prifinium.
(modificada de Piai y cols. 1986)

3. MECANISMO DE ACCION DE BUSCOPAN Y ALGINOR.

Los agentes antimuscarínicos, dentro de los cuales podemos incluir buscopan y alginor, son antagonistas competitivos de las acciones de la acetilcolina y otros agonistas siendo mediadas estas acciones a través de la estimulación de los receptores muscarínicos (GOODMAN y cols. 1991).

Originalmente, los receptores muscarínicos se clasificaron en dos grupos, M_1 y M_2 , en base a la afinidad por los mismos de la pirencepina: unos, de localización cerebral, poseían alta afinidad por pirencepina, y se denominaron M_1 ; otros, que se localizaron en órganos periféricos, tenían baja afinidad por Pirencepina, y se denominaron M_2 (HAMMER y cols. 1980; WATSON, 1984; TSUKAHARA y cols. 1989a). Posteriormente, apareció un nuevo compuesto, AF-DX 116, que además de discriminar entre las respuestas mediadas por los receptores M_1 y M_2 , mostraba una marcada preferencia por los receptores muscarínicos M_2 cardíacos, como lo demuestra el elevado valor de pA_2 observado en corazón (7,3-7,4) comparado con el de músculo liso (6-6,4) (GIACHETTI y cols. 1986; DUCKLES y cols. 1987; MICHELETTI y cols. 1987). Existen otros compuestos que han demostrado poseer cardioselectividad, como la gallamina (BROWN y CROUT, 1970), la metoctramina (MELCHIORRE y cols. 1987) o la himbacina (ANWAR-UL y cols. 1986). Sin embargo, gallamina y metoctramina interactúan, probablemente, de manera alostérica con el receptor muscarínico cardíaco

(EGLEN y cols. 1988; BIRDSALL y cols. 1989; DOODS y cols. 1989). El hecho de que el AF-DX 116 presentase una desigual afinidad dentro de los receptores muscarínicos periféricos llevó a sugerir la heterogeneidad de la población de receptores muscarínicos del subtipo M_2 (GIACHETTI y cols. 1986; HONKANEU y ABDEL-LATIL, 1988) denominándose receptores M_{2A} o $M_{2\alpha}$ a aquellos localizados en el corazón, y como M_{2B} o $M_{2\beta}$ a los presentes en las células musculares lisas (EGLEN y WHITING, 1985). DOODS y cols. en 1987 utilizando técnicas de binding, en diferentes localizaciones (tejido neuronal, corazón y glándulas exocrinas) fueron capaces de clasificar los receptores muscarínicos en 3 tipos: M_1 , M_2 y M_3 . Recientemente, se ha identificado el M_4 y un quinto (sin nomenclatura por el momento) (tabla III) (TSIEN y cols., 1991; TIPS, 1993).

Así, pirencepina tiene mayor afinidad por los M_1 que por los otros dos, metocramina o AF-DX 116 son más selectivos por los M_2 y el 4-DAMP o el parafluorohexahidrosiladifenidol muestran mayor afinidad por los M_3 . Sin embargo, hay que tener en cuenta que ninguno de los antagonistas muscarínicos es altamente selectivo por un subtipo de receptor, con respecto a los otros dos, no disponiéndose en la actualidad de antagonistas que presenten una selectividad mayor por alguno de los receptores de más de dos órdenes de magnitud. Por ello, la caracterización farmacológica del subtipo de receptor muscarínico existente en un determinado tejido debe

Muscarinic acetylcholine receptors

Nomenclature*	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Selective agonists [†]	-	-	-	-
Selective antagonists [‡]	pirenzepine (8.0) telenzepine (9.1)	methoctramine (7.9) AFDX116 (7.3) gallamine (not competitive) himbacine (8.2)	hexahydrostiladitenidol (8.0) <i>p</i> -fluorohexahydrostiladitenidol (7.8)	tropicamide (7.8)
Radioligands [§]	[³ H]pirenzepine	-	-	-
Predominant effectors	IP ₃ /DG	cAMP↓ K ⁺ channel↑ (G)	IP ₃ /DG	cAMP↓
Gene	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>m3</i>	<i>m4</i>
Structural information	460 aa human P11229 7TM 460 aa mouse P12657 7TM 460 aa rat P08483 7TM 460 aa porcine P04761 7TM	466 aa human P08172 7TM 466 aa rat P10980 7TM 466 aa porcine P06199 7TM	590 aa human P20409 7TM 589 aa rat P08483 7TM 590 aa porcine P11463 7TM	479 aa human P08173 7TM 478 aa rat P08485 7TM 490 aa chick P17200 7TM

Other receptors/binding sites: An M₅ receptor with 7TM has been cloned in human (P08912) and rat (P08911). *m5* mRNA has been found in the CNS but a translation product has not been found *in vivo*. The human form has 532 aa.

*Muscarinic Receptor Nomenclature Committee (November 1992)

[†]An example of an agonist selective for muscarinic receptors relative to nicotinic receptors is oxotremorine-M.

[‡]No antagonist has a potency on one receptor that is more than tenfold greater than its potency on the other receptor subtypes; all receptors have K_i values for

(-)-*N*-methylscopolamine and (-)-3-quinuclidinylbenzilate of less than 1 nM.

[§][³H]-(-)-*N*-methylscopolamine and (-)-[³H]-3-quinuclidinylbenzilate are nonselective radioligands.

TABLE III

basarse en el espectro de afinidades que presenten una serie de antagonistas, entre los que se incluyan al menos uno para cada subtipo de receptor. En la tabla III se muestra la nomenclatura para los distintos subtipos de receptores, los antagonistas más selectivos, el mediador celular de la respuesta, el gen que los codifica y otra información adicional acerca de la estructura, determinada en humanos, de dichos receptores.

Aunque se han encontrado receptores muscarínicos en diferentes tipos de células, su presencia en neuronas, músculo liso y cardíaco, células exocrinas, endocrinas, paracrinas y endoteliales tiene una especial importancia (GOYAL, 1989). Tanto en el sistema nervioso central como periférico existe un gran número de neuronas que presentan receptores muscarínicos. Estos receptores se encuentran en el soma y en las dendritas de muchas neuronas colinérgicas, no colinérgicas y en las terminaciones de algunos axones (GOYAL, 1989); más aún, una misma neurona puede contener receptores muscarínicos excitatorios e inhibitorios (KILBINGER y cols. 1984). A nivel cerebral se han identificado sitios de fijación a nivel presináptico, tanto en corteza como en hipocampo (McKINNEY y RICHELSON, 1984), y se han descrito los subtipos M_1 y M_2 en neuronas corticales (BONNER y cols. 1987). La estimulación de estos receptores puede producir excitación celular por mecanismos que implican una disminución de la conductancia a K (CHRISTIE y NORTH, 1988).

Los receptores muscarínicos que producen inhibición se asocian con hiperpolarización de las neuronas debido a la apertura de los canales de K, mediada a través de proteínas G_k (GOYAL, 1989). Mediante estudios bioquímicos, FISHER y BATUS (1985) han determinado que la activación los de receptores muscarínicos en el hipocampo estimula el sistema de los fosfoinositoles. En esta región del cerebro, bajas concentraciones de pirenzepina bloquean el recambio de los fosfoinositoles (FISHER y BATUS, 1985; GIL y WOLFE, 1985) lo que indica que los receptores con alta afinidad por pirenzepina están acoplados a dicho recambio en esta zona cerebral.

La estimulación de los receptores M_2 cardíacos por concentraciones nanomolares de acetilcolina disminuye la frecuencia cardíaca, al inhibir la corriente activada por hiperpolarización, implicada en la generación de la actividad del marcapasos o I_f (DI FRANCESCO y cols. 1989). Concentraciones moderadas de Ach inhiben el músculo cardíaco, disminuyendo la potencia y la frecuencia de contracción (PAPPANO y cols. 1988). Tanto la proteína G_i como las G_k median la inhibición cardíaca; la activación de las proteínas G_i disminuye los niveles de AMPc, reduce la actividad de las protein-kinasas dependientes de AMPc y disminuye la fosforilación de los canales de Ca de la membrana plasmática; el cierre de los canales de Ca voltaje-dependientes disminuye los niveles de Ca en el interior celular (GOYAL, 1989). La

activación de las proteínas G_k , directa e indirectamente, disminuye los niveles intracelulares de K , lo que produce hiperpolarización e inhibición de la actividad marcapaso y de la excitabilidad cardíaca (GOYAL, 1989). La estimulación de los receptores cardíacos puede producir aumento de los niveles de $GMPc$, aunque no existe certeza del papel del $GMPc$ en la función cardíaca (WATANABE, 1983). Además, la interacción del agonista muscarínico con su receptor, probablemente activa una proteína reguladora (G_p) que activa a su vez la fosfolipasa C, la cual hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, con la consiguiente formación de IP_3 y DG (DOODS y cols. 1989), aunque las concentraciones de agonista necesarias para estimular el recambio de los fosfoinosítoles por los receptores M_2 son aproximadamente 10 veces mayores que las necesarias para dicha estimulación a través de receptores M_1 o M_3 (LECHLEITER y cols. 1989).

Mediante estudios de fijación de radioligandos, se ha sugerido que el músculo liso posee receptores M_2 y M_3 , aunque funcionalmente parecen ser los M_3 los que median la contracción (LADINSKY y cols. 1988). Estudios recientes han demostrado que los subtipos moleculares M_2 y M_3 son los que se expresan en el músculo liso (MAEDA y cols. 1988); la estimulación de dichos receptores origina un aumento en la estimulación del recambio de fosfatidil inositol por proteínas G_p , que aumenta la movilización del Ca intracelular y la entrada

de Ca (CHRISTIE y NORTH, 1988), dando lugar a la contracción. La primera fase de la contracción se explicaría por la liberación de Ca intracelular por el IP_3 y la entrada del mismo desde el exterior por canales voltaje-dependientes (CVDs) específicos, lo que conlleva un aumento de la concentración citosólica de Ca libre (BERRIDGE e IRVINE, 1984). La función de la proteincinasa (PKC) en la contracción muscular no está del todo clara; su activación por el diacilglicerol (DG) participaría en el mantenimiento de la respuesta contráctil a pesar de que los niveles intracelulares de Ca hayan disminuido hasta valores casi similares a los de la célula en reposo. RASMUSSEN y cols. (1987) propusieron que la PKC podría estar implicada en la modulación de la respuesta contráctil a través de cambios de la concentración de Ca en una zona restringida de la célula. Estos autores sugieren que sería un acúmulo de Ca en la cara interna de la membrana plasmática, y su activación, lo que determinaría la magnitud de la respuesta contráctil, siendo los cambios en la concentración de este ión unido a la membrana los responsables del mantenimiento del tono (RASMUSSEN y cols. 1987). Además, la PKC podría fosforilar diversas proteínas que intervienen en la respuesta contráctil (NISHIKAWA y cols. 1983; RASMUSSEN y cols. 1987). Por último, la activación de los receptores muscarínicos musculares puede antagonizar los efectos relajantes de la estimulación β -adrenérgica, mediados por

incremento de los niveles intracelulares de AMPc y apertura de los canales de K⁺ (SIMS y cols. 1988).

A nivel de las células exocrinas (glándulas lacrimal, parótida y submandibular), los receptores implicados parecen ser del subtipo M₁, siendo el subtipo molecular M₂ el codificado por el RNAm en el tejido glandular (AKIBA y cols. 1988; SCHIAVONE y BRAMBILLA, 1991). La secreción que se produce por estimulación de estos receptores está mediada por activación del recambio de fosfatidil inositol y movilización del Ca intracelular, a través de la activación de proteínas Gp (LOUIE y OWYANG, 1986).

Como ya se ha comentado anteriormente, los receptores muscarínicos están ampliamente distribuidos en el tejido vascular y pueden mediar dos tipos de respuestas: contracción directa y relajación indirecta mediada por la liberación de EDRF o por la inhibición de la liberación de noradrenalina (NA) (VANHOUTTE y SHEPHERD, 1973; FURCHGOTT y ZAWAZDKI, 1980; VANHOUTTE y SHEPHERD, 1983). En cuanto al subtipo de receptor muscarínico implicado en cada una de estas respuestas, podemos decir que en la mayor parte de las preparaciones, el receptor que modula la respuesta mediada por EDRF es del subtipo M₂ y el que media la inhibición de la liberación de NA del subtipo M₁ (EGLIN y WHITING, 1990). La acetilcolina también da lugar a respuestas contráctiles, generalmente en territorio venoso, donde el subtipo de receptor implicado es el M₁ (EGLIN y WHITING, 1990). La Acetilcolina también

produce la contracción en arterias coronarias porcina y bovina y aorta de conejo, un efecto mediado a través de receptores muscarínicos del subtipo M_1 (DUCKLES, 1988; VAN CHARLDORP y VAN ZWIETEN, 1989), mientras que el subtipo que media la contracción en arteria basilar de cerdo es M_2 (VAN CHARLDORP y VAN ZWIETEN, 1989).

La presencia de receptores muscarínicos de localización endotelial ha sido muy discutida. Así, hay autores que usando técnicas autorradiográficas y de fijación de radioligandos con [3H]-quinuclidinilbencilato sugieren la ausencia de estos receptores (STEPHENSON y SUMMERS, 1987; STEPHERSON y cols. 1988; DE MICHELE y cols. 1989), mientras que otros, empleando las mismas técnicas indican la presencia de estos receptores a nivel endotelial (SIM y MAIJEET, 1989; TSUKAHARA y cols. 1989a), aunque en menor densidad que en el músculo (TSUKAHARA y cols. 1989b). En 1985, PARNAVELA y cols. 1985, evidenciaron la presencia del enzima que sintetiza colinoacetiltransferasa, en el endotelio de vasos cerebrales de rata, sugiriendo que las células endoteliales podrían captar colina de la circulación y sintetizar Ach, que actuaría entonces localmente sobre receptores muscarínicos del endotelio. Se conoce poco acerca del mecanismo de transducción implicado en la síntesis o liberación de EDRF(s). Así, el tratamiento con la toxina pertussis en arterias coronarias porcinas abole la relajación mediada por EDRF inducida por el agonista α_2 -adrenérgico UK 14304 ó 5-Hidroxisero-tonina, sin afectar a la

producida por adenosina o el ionóforo de Ca A 23187 (FLAVAHAN y cols. 1989), mientras que en arteria pulmonar de conejo la toxina no modifica la relajación endotelio-dependiente inducida por Ach, ATP, sustancia P o el ionóforo A 23187 (HOLFELD y cols. 1990).

Desde el punto de vista experimental, podemos diferenciar los receptores muscarínicos con un antagonista clásico de estos receptores, la atropina (que no discrimina entre los receptores M_1 y M_2) siendo un antagonista muy selectivo de los agentes muscarínicos en los receptores correspondientes del músculo liso y cardíaco y de las células de las glándulas exocrinas.

Diferentes trabajos, sugieren la presencia de receptores tipo M_2 en la fibra muscular lisa (MADISON y cols. 1987) y la existencia de una selectividad especie dependiente para los subtipos M_1 y M_2 de receptores muscarínicos (YAMANAKA y cols. 1986; DUCKLES, 1988) realizados en arteria aorta de bovino, conejo y perro, según la localización de la FMLV dentro de la misma especie.

TABLA IV . RECEPTORES MUSCARINICOS VASCULARES Y CARDIACOS
 ESPECIE Y TERRITORIO DEPENDIENTE.

	M ₁	M ₂
Aorta bovina	+	-
Aorta conejo	-	+
Aorta perro	-	+
Coronaria perro	+	+
Coronaria oveja	-	+
Corazon	-	+

Tomada de Yamanaka y cols. 1986 (Yamada y cols. 1988; Duckles y cols. 1987).

La mayor parte de los trabajos para caracterizar los diferentes subtipos de receptores muscarínicos M₁ y M₂ han sido realizados por técnicas de "binding" (YAMANAKA y cols. 1986; DUCKLES, 1988) y mediante técnicas de biología molecular, donde se identificaron y expresaron los RNAm correspondientes a los distintos subtipos de receptores muscarínicos M₁ y M₂ (FUKUDA y cols. 1987).

El bloqueo de los de receptores muscarínicos a nivel arterial no es tan relevante como para explicar la acción vasodilatadora de buscopán y alginor lo que sugiere que otros posibles mecanismos de acción podrían estar implicados tales como:

- Posibles interacciones con los flujos de entrada o salida de Ca.

- Posible acción a nivel del Ca intracelular.
- Posible acción a nivel del factor de relajación endotelial (EDRF) (TSUKAHARA y cols. 1989a).

El papel jugado por el EDRF no está claro dentro de las funciones de los receptores muscarínicos (MILLER y cols. 1988; DUCKLES y cols. 1987).

4. MECANISMOS BASICOS DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR.

Para la célula eucariótica en reposo es fundamental mantener la concentración de Ca ionizado en el citosol por debajo de $10^{-7}M$, es decir, una concentración 10.000 veces menor que la del ión Ca extracelular. El contenido total de Ca en la célula (incluido el almacenado en mitocondrias y retículo sarcoplásmico) es aproximadamente de 1 mmol/g, lo que indica que, teóricamente, entre los orgánulos celulares y el citosol existe también un gradiente de 10.000.

Después de un estímulo y para poder inducir su función fisiológica, la [Ca] iónico libre en el citosol se incrementa hasta aproximadamente $10^{-5}M$, lo que representa durante un tiempo limitado una concentración 100 veces superior a la de reposo. Incluso en estas condiciones, el gradiente entre el espacio intra y extracelular y entre los lugares de fijación y citosol, es de 100 respectivamente.

Es obvio que esta distribución, que no es precisamente una situación de equilibrio, requiere mecanismos que sean

capaces de mantener de forma eficaz las diferentes concentraciones de Ca en los diferentes compartimentos (tales como el espacio extra e intracelular o el espacio extra e intrarretículo sarcoplásmico). Esta compartimentación es necesaria para poder transportar el Ca desde el citosol al espacio extracelular, para almacenar el Ca que excede a las necesidades fisiológicas intracelulares y para garantizar la adecuada entrada o liberación de Ca hacia el citosol.

En condiciones fisiológicas normales, este sistema es capaz de mantener la concentración de Ca intracelular siempre por debajo de niveles tóxicos. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, este sistema puede fracasar rápidamente, permitiendo una entrada masiva de Ca que al no ser recaptado en organelas intracelulares o expulsado fuera de la célula conduce a un incremento de [Ca] intracelular, que origina disfunciones celulares y, eventualmente, conduce a la muerte celular (PETERS, 1988).

4.1. MECANISMO DE ENTRADA DEL Ca EN LAS CELULAS.

1.- La capa lipídica de la membrana da lugar a diferentes barreras para la difusión de los iones. La parte central, formada por la interacción de los ácidos grasos, forma una barrera fuertemente lipofílica, mientras que en los lados interno y externo de la membrana las moléculas de agua se estructuran uniendo fuertemente los grupos que constituyen

las cabezas de los fosfolípidos. Los grupos carboxílicos y fosfato, eléctricamente cargados, así como los glicopeptidos, dan lugar a fuerzas de atracción y repulsión para los iones, lo que en determinadas circunstancias origina una difusión retardada de los iones. Dado que la energía que se requiere para transportar iones a través de la bicapa lipídica es proporcional a las cargas de éstos, se puede deducir que la permeabilidad para el calcio es menor que la del sodio o el potasio.

2.- La presencia de moléculas protéicas en la bicapa lipídica aumenta notablemente la permeabilidad de la membrana celular (ZWAAL y cols. 1973; BENGA, 1985). Se especula con la posibilidad de que, debido a las interacciones proteína-lípido, existe un aumento de la permeabilidad en las zonas donde se localiza la proteína inserta en la membrana. De acuerdo con lo expuesto, este tipo de proteína "permeabilizadora" pudiera cambiar su estructura y por tanto su nivel de interacción con el entorno lipídico en función de los diferentes grados de polarización de la membrana (PETERS, 1988).

3.- Se ha comprobado que, en determinados tipos de células, algunos estímulos fisiológicos "abren" los canales a través de los cuales el calcio entra en las células de acuerdo con el gradiente de concentración extra e intracelular (CAMPBELL, 1985). Estos canales pueden ser activados por interacciones fármaco receptor, p.e.: catecolaminas, o pueden

ser activados por cambios en el potencial de membrana. Dependiendo del mecanismo se denominan canales receptor-dependientes (CRDs) (BOLTON, 1979; VAN BREEMEN, 1979) o canales voltaje-dependientes (CVDs).

4.2. MOVIMIENTOS DE CALCIO HACIA EL EXTERIOR DE LA CELULA.

La reducción de la $[Ca]$, responsable de la relajación, es consecuencia de: a) la activación de un sistema de intercambio Na/Ca a nivel del sarcolema. Sin embargo, este proceso tiene un papel mínimo en la relajación de la FMLV como más adelante comentaremos; b) una ATPasa Ca-dependiente activada por la calmodulina que se encuentra, tanto a nivel del sarcolema, como en las membranas sarcoplasmicas (CAUVIN y cols. 1983). Esta ATPasa induce, por tanto, la salida de Ca al medio extracelular o su almacenamiento en el retículo sarcoplásmico. El proceso de reincorporación de Ca en el retículo sarcoplásmico es un proceso activo que implica la activación de una proteína, el fosfolambdano, que cuando se fosforila, por la acción del AMPc, aumenta la reincorporación de Ca reduciéndose la $[Ca]_i$ (KRAMER y HARDMAN, 1980; HANLEY y STEINER, 1990).

4.3. PAPEL DEL CALCIO EN LAS FIBRAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

En los apartados anteriores hemos visto el importante

papel que juega el Ca en los mecanismos básicos de la homeostasis celular, nos vamos a limitar en este apartado al papel del Ca dentro de la FMLV.

El acoplamiento excitación-contracción en las FMLV viene determinado por un aumento en la concentración de Ca ($[Ca]$) intracelular, siendo este factor el principal determinante para llevar a cabo el acoplamiento. El incremento del Ca intracelular puede ser consecuencia de un aumento en el flujo de entrada de Ca a través del sarcolema y/o de un aumento en la movilización del Ca almacenado en determinados depósitos intracelulares (GORDON, 1978; BOLTON, 1979; DROOGMANS y CASTEELS, 1984).

De este modo se seleccionan proteínas capaces de funcionar como "receptores" intracelulares del Ca (como la calmodulina, troponina C, parvalbúmina y otras) que permitían respuestas diferenciadas y específicas al ión (BURNEY y NEERING, 1987). El Ca presenta algunas propiedades de importancia fisiológica únicas entre los cationes, entre las que se encuentra la capacidad de interaccionar con iones orgánicos de grandes dimensiones tales como algunos grupos aniónicos (hidroxilos, carbonilos y carboxilos) presentes en proteínas y péptidos; el magnesio, por ejemplo, si bien se encuentra en la célula a concentraciones mayores, está más hidratado, lo que disminuye sus posibilidades de fijación.

El Ca también se fija a ligandos no protéicos como los nucleótidos de adenina, el ácido cítrico y los fosfatos.

Estas propiedades le proporcionan unos papeles biológicos clave entre los cuales principalmente los de: a) constituyente estructural de la membrana y del tejido óseo, b) cofactor de enzimas, c) regulador intracelular de algunos procesos fundamentales como la secreción y la contracción y d) vehículo de una carga en los procesos eléctricos de membrana (GOVONI, 1990).

Por consiguiente, las funciones del Ca van mucho más allá de las de un elemento importante para la integridad estructural del organismo, así como de cada célula, y comprende la regulación de algunos procesos celulares fundamentales (GOVONI, 1990).

4.4. ENTRADA DE CALCIO EXTRACELULAR

4.4.1. Despolarización de la membrana.

La despolarización de la membrana de células musculares lisas, ya sea debida a potenciales de acción o por concentraciones altas de K^+ , se acompaña de contracciones que pueden inhibirse por lantano, cationes divalentes (BOLTON, 1979) y bloqueantes orgánicos del Ca (CAUVIN y cols. 1983). La existencia de canales de Ca voltaje-dependientes se ha comprobado tanto en células musculares lisas electricamente activas como en aquellas que normalmente no generan potenciales de acción (BOLTON y cols. 1988b).

Las contracciones inducidas por KCl son muy dependientes de la concentración de Ca extracelular (HINKE, 1965; HINKE y cols. 1964; BRIGGS, 1962). El bloqueo de la contracción por antagonistas orgánicos del Ca y la ausencia de respuesta al KCl en ausencia de Ca extracelular señalan la entrada de Ca extracelular como mecanismo responsable de la contracción durante la despolarización, hecho comprobado tras la determinación flujo de ^{45}Ca lo que ha puesto de relieve algunos aspectos destacables de la contracción producida por KCl:

1.- La entrada de Ca requerida por una contracción máxima es mucho mayor a la teóricamente necesaria para ocupar los sitios de unión de la calmodulina citosólica; lo cual sugiere que gran parte del Ca que entra es almacenado por organelas intracelulares o bien se fija a componentes del citosol (LOUTZENHINSER y cols. 1985).

2.- Las dosis más bajas de KCl provocan una contracción sin que se produzca una entrada significativa de ^{45}Ca . Es posible que el mecanismo de liberación de Ca inducida por el Ca juegue un papel en la fase inicial de la activación inducida por despolarización (SAIDA y VAN BREEMEN, 1989). Sin embargo, el hecho de que el KCl no produzca contracción alguna en ausencia de Ca extracelular (VAN BREEMEN, 1979) y aunque no se puede descartar un mecanismo amplificador en dosis bajas, parece improbable una liberación de $(\text{Ca})_i$ inducida por despolarización. Por otra parte, la estrecha relación entre captación de ^{45}Ca y tensión inducida por KCl

sugiere la no contribución del fenómeno "Ca libera Ca" en la fase estable de la contracción.

FABIATO y FABIATO (1979) exponen una teoría por la cual la "liberación de Ca inducida por Ca" ocurre en función de la velocidad de cambio de la concentración del Ca citosólico. Esto sólo puede ocurrir en la fase inicial de la activación inducida por KCl, cuando la entrada de ^{45}Ca se produce con mayor rapidez. Al igual que ocurre en el corazón (FABIATO y FABIATO, 1972,1979), un incremento rápido en el Ca del citosol puede disparar la liberación de Ca intracelular. Durante la fase estable de la contracción obtenida con KCl, las reservas intracelulares reiniciarían el almacenamiento de Ca.

4.4.2. Acoplamiento excitación-contracción.

El acoplamiento excitación-contracción es la cadena de eventos que acoplan la estimulación de la membrana plasmática con la activación de las proteínas contráctiles. La mayoría de nuestros conocimientos sobre el acoplamiento excitación-contracción se ha deducido del estudio del músculo esquelético, cardíaco y liso por lo cual no se puede directamente generalizar el modelo de músculo esquelético.

Vamos a tratar de exponer los conocimientos sobre el músculo liso y, en especial, el vascular. La interferencia en cualquier paso de la secuencia de sucesos de este acopla-

miento puede producir la relajación vascular. El factor que acopla la excitación con la contracción es el aumento de la concentración del Ca en el citosol que puede provenir de fuentes intra o extracelulares.

4.4.3. Mecanismos de regulación de la interacción actina-miosina.

El mecanismo primordial para la regulación de la interacción actina-miosina por la activación dependiente del Ca es complejo. Se han propuesto distintos mecanismos bioquímicos según sea el miofilamento que regula el proceso, el grueso (miosina) o el delgado (actina y tropomiosina) y las proteínas reguladoras que median los efectos del Ca (STULL y cols. 1980). Utilizando proteínas contráctiles purificadas en experimentos bioquímicos se proponen los siguientes mecanismos:

- 1) Fosforilación de la miosina dependiente del Ca y la calmodulina.
- 2) Unión directa del Ca a la miosina.
- 3) Regulación por el Ca de los miofilamentos delgados.
- 4) Activación del filamento delgado por el Ca en unión al sistema leiotonina.
- 5) Regulación del filamento delgado por el Ca y la proteína caldesmon.

4.4.4. Canales de entrada de Calcio

Los canales de Ca de la membrana plasmática juegan un papel crucial en la iniciación de las señales Ca a nivel de las terminaciones sinápticas, corazón, músculo liso, células cromafines y células β secretoras de insulina (BERRIDGE, 1986).

La estructura que permite la variación de las $[Ca]$ es un canal selectivo que deja pasar un gran número de iones en un tiempo muy breve. Los iones de Ca que pasan por los canales de Ca funcionan como mensajeros químicos para una diversidad de procesos fisiológicamente importantes como el acoplamiento excitación-contracción, la conducción de impulsos, la actividad neuronal y el acoplamiento excitación-secreción.

Los canales de Ca son unas estructuras macromoleculares constituidas esencialmente por una o más glicoproteínas, embebidas en la bicapa lipídica, con una configuración bastante cilíndrica y un poro acuoso en su centro (REUTER, 1983).

Durante años han sido propuestas dos vías de entrada de Ca en la fibra muscular lisa vascular (BOLTON, 1979; STANFIELD, 1986; NEHER, 1987; TAYLOR, 1987; MARTY, 1989):

a) Canales activados por voltaje (VOCs)

Son activados por la despolarización de la membrana. Se puede conseguir la apertura de este canal por despolarización con elevadas concentraciones de KCl en el medio.

b) Canales activados por agonistas (ROCs)

Son activados por la interacción de un agonista (catecolaminas, 5-HT, angiotensina II) con su receptor específico. Este canal se abre al añadir un agonista al medio.

Además han sido propuestos otros canales:

c) En situación de reposo existe una vía pasiva o canal de goteo (leak channel) que permite la entrada continua de pequeñas cantidades de Ca a favor de un gradiente electroquímico, debido a que la membrana celular no es totalmente impermeable a los iones. La existencia de este canal se ha demostrado por el lento intercambio del Ca celular con el Ca extracelular radiactivo, en preparaciones en reposo incubadas con ^{45}Ca (CAUVIN y cols. 1983; VAN BREEMEN, 1986). Este canal es poco sensible a los ACa.

Este canal está alterado en la hipertensión, de tal forma, que en condiciones patológicas podría existir un goteo aumentado de Ca que daría lugar a una sobrecarga continua de Ca en las fibras musculares lisas vasculares, lo que explicaría el aumento de las resistencias vasculares periféricas característico de esta enfermedad (VAN BREEMEN, 1986).

d) Canales activados por un segundo mensajero (SMOCs)

La activación de estos canales depende de un segundo mensajero producido a nivel intracelular en respuesta a la acción de un agonista sobre un receptor específico en la membrana (MELDOLESI y POZZAN, 1987; TSIEN y TSIEN, 1990). Los SMOCs se encuentran en linfocitos, neutrófilos, plaquetas y

mastocitos, siendo el segundo mensajero que activa la mayoría de estos canales, el IP_3 . En estos canales la dependencia de voltaje es inversa a la que muestran los VOCs, aumentando la entrada de Ca al hiperpolarizar la membrana por lo que podrían participar en la regulación del potencial de reposo (LEWIS y CAHALAM, 1990).

4.4.5.1. Canales activados por voltaje (VOCs)

Se caracterizan fundamentalmente por su activación-apertura cuando la célula se despolariza (BOLTON, 1979; REUTER, 1983; BEAN, 1989). Los VOCs poseen un sensor de voltaje que se modula por las variaciones del potencial transmembrana. Las variaciones de dicho potencial vienen dadas por la unión de cationes divalentes, especialmente Ca, a la membrana celular que se encuentra cargada negativamente. Así mismo los VOCs canales también constan de filtros de selectividad, que son responsables de que el canal presente una especificidad para el Ca sobre otros cationes (ARTALEJO y GARCIA, 1986; SPEDING y PAOLETTI, 1992).

Se ha definido la existencia de varios tipos de VOCs, mediante técnicas electrofisiológicas y farmacológicas: canal T o transitorio, canal L o larga duración, canal N o neuronal.

Los canales T y L se han identificado en neuronas, músculo cardíaco, esquelético y liso (HOFMANN y cols. 1987).

Los canales N se encuentran principalmente en las terminaciones nerviosas y se encuentran ausentes en las células de Purkinje cerebelosas (SPEDDING, 1987), jugando un papel fundamental en la liberación de neurotransmisores (WATSON y ABBOTT, 1992).

LLINAS y cols. (1989 a,b) describieron la existencia de un nuevo canal observado en células de Purkinje del cerebelo y también dependiente de voltaje y distinto del canal N, al que denominó canal P. Las características de este canal P son que se activa a -50 mV (presinapsis terminal del calamar) y desde el punto de vista farmacológico se bloquea por la FTX (toxina de la araña Funnel web) y no por la w-conotoxina (veneno del caracol marino), que bloquea específicamente el canal N, (TSIEN y cols. 1991; VENEMA y cols. 1992).

Se han registrado las corrientes de Ca en células musculares de arterias y venas (BENHAM y cols. 1987; BENHAM, 1990) sugiriendo la existencia de dos tipos de canales de Ca en fibras musculares lisas vasculares. Son los canales T y L con propiedades similares a los descritos en otros tipos celulares.

Los canales T y L muestran entre otras las siguientes diferencias:

a) Umbral de activación. Los canales L son definidos actualmente como activados por alto voltaje (HVA), es decir, necesitan señales de despolarización intensa lo cual lleva a la aparición de una corriente de Ca de larga duración;

mientras que los canales T son activados por bajo voltaje (LVA), necesitan despolarizaciones débiles para su abertura y se inactivan rápidamente (TSIEN y cols. 1991).

b) Conductancia. La conductancia de los canales T es de aproximadamente 9 picosiemens, y la de los canales L es de alrededor de 25 picosiemens (BENHAM y cols. 1987).

c) Distribución celular. Los canales L se encuentran en prácticamente todos los tejidos excitables siendo una de las vías más importante para la entrada de Ca en corazón y músculo liso, estando implicados en el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco y vascular, en la expresión de los protooncogenes C-fos y c-myc (hipertrofia vascular) y en la duración del potencial de acción (MARTY, 1989; TAMARGO, 1992). Los canales T se encuentran en una extensa variedad de tejidos excitables y están principalmente ausentes en algunas células (células adrenocromafines y neuronas simpáticas) (TSIEN y cols. 1991) y regulan la frecuencia de la actividad miogénica de las células musculares lisas vasculares (MARTY, 1989; SPEDING y PAOLETTI, 1992)

d) Sensibilidad a los agonistas y ACa. Sólo los canales L pueden modularse farmacológicamente, bloqueándose por los ACa y activándose por diversos agonistas (catecolaminas, angiotensina II, 5-HT) (NOWYCK y cols. 1985a; BENHAM y cols. 1987; NAYLER, 1988). Los canales T no son afectados por estas sustancias (NOWYCK y cols. 1985a), pero se bloquean por tetrametrina y níquel (HAGIWARA y cols. 1988; TAMARGO, 1992).

También, es posible identificar ambos tipos de canales utilizando diversas toxinas; la conotoxina-w bloquea los canales L y N y no bloquea los T, pero además, discrimina entre los canales L neuronales, a los que sí bloquea y a los musculares a los que no bloquea (REYNOLDS y cols. 1986; CRUZ y cols. 1987). La neurotoxina taicatoxina (serpiente marina) bloquea de forma específica los canales L musculares pero no los nerviosos ni los T (BROWN y cols. 1987).

Por tanto, aquellos territorios vasculares en los que exista una mayor densidad de canales de Ca tipo L, serán mucho más sensibles a la acción de los ACA. Se ha demostrado que la arteria coronaria del cerdo contiene el doble de puntos de unión para las dihidropiridinas que la aorta (CAUVIN y VAN BREEMEN, 1985); mientras que en la aorta existe un gran número de receptores alfa-adrenérgicos acoplados a la liberación del Ca almacenado a nivel intracelular y resistente a los ACA (SPEDDING y cols. 1990). Estos datos explicarían porque la arteria coronaria es mucho más sensible a los ACA que la aorta (selectividad vascular) (TAMARGO, 1992).

El canal voltaje dependiente tipo L puede encontrarse en tres estados o conformaciones diferentes: estado abierto (activado), inactivado y cerrado (reposo) (HONDEGHEM y KATZUNG, 1984). La cinética de apertura/cierre del canal de Ca es voltaje dependiente, aumentando la probabilidad de apertura con la despolarización. El Ca solo puede atravesar el canal cuando este se encuentra en su conformación abierta.

La cinética de activación del canal de Ca sigue un modelo secuencial de tres estados (cerrado-abierto-inactivado); el canal inactivado ha de volver al estado cerrado, es decir que se reactive, para poderse abrir de nuevo (TRIGGLE, 1982; REUTER, 1983; HURWITZ, 1986; NAYLER, 1988; TAMARGO, 1992) (figura 5).

Existe, además, una regulación independiente del potencial de membrana que es llevada a cabo a través de procesos celulares, tales como, la fosforilación; en este caso una modificación química determina si un canal será o no capaz de abrirse en respuesta a un cambio del potencial (NELSON y cols. 1990).

Los agentes farmacológicos, agonistas y A_{Ca}, alteran la cinética de apertura y cierre del canal (HESS y cols. 1984). Los agonistas como el BAY K 8644, que facilitan la entrada de Ca, inmovilizan el canal en estado de apertura (HESS y cols. 1984). Mientras que los A_{Ca}, tipo dihidroxipiridinas, que bloquean el movimiento de Ca a través del canal, estabilizan el estado de cierre (WORLEY y cols. 1989).

El estado inactivo del canal voltaje dependiente tipo L es promovido tras despolarizar el potencial de membrana. Los A_{Ca} son hasta 2.000 veces más efectivos cuando el potencial de membrana es de -10 mV (el 70 % de los canales están inactivos) que cuando es de -80 mV (la mayoría de los canales no están inactivados). Por tanto, los A_{Ca} presentan

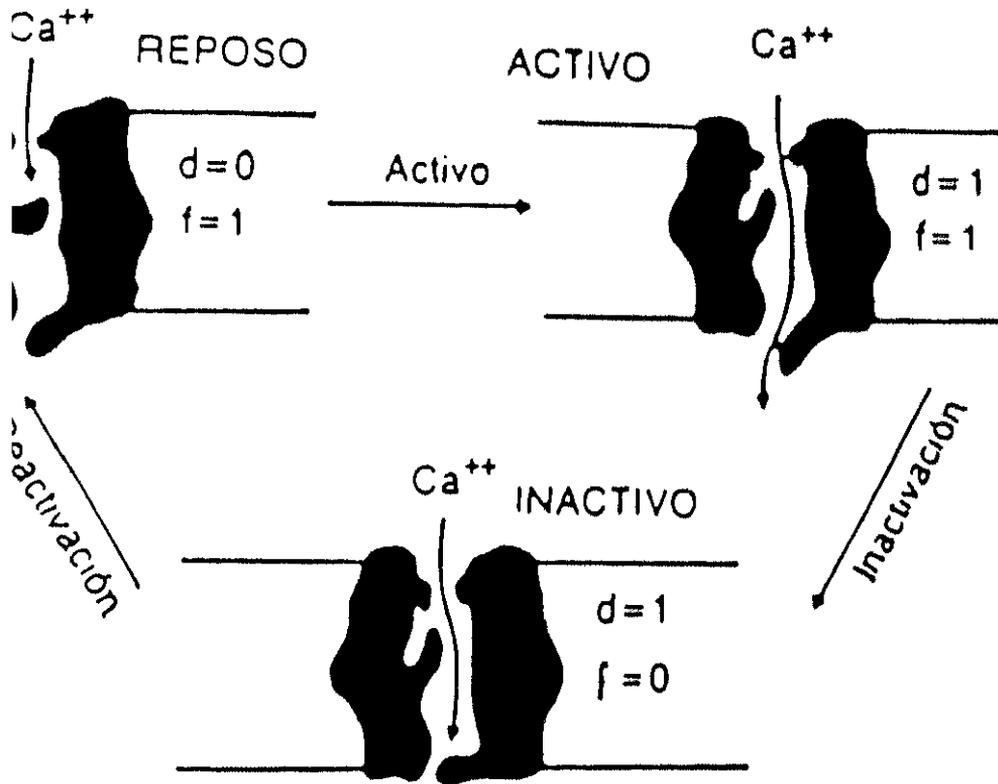


FIGURA 5

representación esquemática del canal de Ca^{++} en los tres estados que puede presentar: Reposo, Activado e Inactivado. d = compuerta de activación; f = compuerta de inactivación. 0 = cerrada; 1 = abierta. (Tomado de TAMARGO Y VALENZUELA, 1977).

mayor afinidad y son más efectivos (selectividad tisular) en las células musculares lisas vasculares que presentan un potencial de membrana de alrededor de -60 mV, que en células musculares auriculares o ventriculares cuyo potencial de reposo oscila entre los -80 y -90 mV. Más aún, el hallazgo de que los diferentes territorios vasculares presentan distintos niveles de potencial de membrana (CAUVIN y cols. 1984; CAUVIN y VAN BREEMEN, 1985; JANIS y cols. 1987) permite explicar porque unos lechos vasculares son más sensibles que otros a los ACa. Incluso, aunque dos territorios vasculares presenten niveles de potencial de membrana similares pueden responder de forma distinta a los agonistas; así, la NA apenas despolariza el potencial de membrana en la arteria aorta, pero sí despolariza el de los vasos de resistencia (CAUVIN y cols. 1984; CAUVIN y VAN BREEMEN, 1985); esto explicaría porque los vasos de resistencia son más sensibles a los ACa que los de conductancia.

Los ACa modulan el funcionamiento de los canales de Ca de tipo L al unirse a zonas específicas o "receptores". Estudios de radioligandos, relaciones estructura-actividad y estudios moleculares han permitido conocer el número y la afinidad de los lugares de unión (VAGHY y cols. 1987 a,b; TSIEN y cols. 1991; SLISH y cols. 1992). Dichos canales contienen 5 subunidades designadas como alfa-1, alfa-2, beta,

gamma y delta. La única subunidad que contiene territorios de fijación para los ACa es la subunidad alfa-1; se trata de una proteína transmembrana que se fosforila "in vitro" por distintas quinasas (TAKAHASHI y cols. 1987). La subunidad alfa-1 presenta territorios de unión separados pero íntimamente relacionados para las fenilalquilaminas, las dihidropiridinas y las benzotiazepinas, que explicaría porque la presencia de uno de estos fármacos influye en la actividad de fijación de los otros (inactivación alostérica). La fijación de los ACa es esteroespecífica, saturable y reversible, existiendo una buena correlación entre las características de fijación y su actividad farmacológica (REUTER, 1983; TAMARGO, 1992).

Una importante propiedad de los canales del Ca tipo L es su plasticidad, aumentando su número en diversas situaciones fisiológicas (por ejemplo, con la edad) o patológicas (hipertensión arterial, cardiomiopatías), así como tras la ingesta de sal o la administración de fármacos (opiáceos, neurolépticos, alcohol o fármacos que aumentan los niveles celulares de AMPc) (NAYLER, 1988; GOVONI y cols. 1988; GOVONI, 1990). Esto permitiría explicar porque el hipertenso y en particular aquellos en los que no hay una importante restricción de sal en la dieta, responden muy bien a los ACa (MESSERLI, 1990). El número de canales voltaje dependientes L disminuye tras la administración de ACa y en

aquellas situaciones en las que disminuyen los niveles celulares de ATP (ejemplo, durante la isquemia) (NAYLER, 1988; GOVONI, 1990; MESSERLI, 1990).

4.4.5.2. Canales activados por agonistas (ROCs)

Se activan tras la interacción de un agonista (NA, 5-HT, acetilcolina, etc.) con su receptor específico situado en la membrana (BOLTON, 1979; NEHER, 1987; TAYLOR, 1987; TSIEN y TSIEN, 1990).

Estos canales son discutidos en la literatura, ya que mientras que los VOCs han sido demostrados en músculo liso vascular (WORLEY y cols. 1986; BENHAM y TSIEN 1988), los ROCs o canales voltaje insensibles, como también se les denomina, no han sido identificados (NELSON y cols. 1990). Por otra parte se ha demostrado la existencia de VOCs sensibles a catecolaminas (BENHAM y cols, 1987; NELSON y cols. 1988). Estos hechos hacen necesaria una revisión de la posible naturaleza de los ROCs.

Se ha descrito que la apertura de los ROCs es independiente de un cambio en el potencial de reposo de la célula muscular (DROOGMANS y cols. 1977; VAN BREEMEN y cols. 1982). VAN BREEMEN (1986) propone que en aorta de conejo, los ROCs no son activados por despolarización de la membrana, ya que cuando se miden los cambios del potencial de membrana inducidos por la NA no es posible observar despolarización,

aunque si se observa una marcada respuesta contráctil, y un aumento en el flujo de entrada de Ca. Sin embargo, no todos los vasos se comportarían de la misma forma; cuando estudiamos arterias mesentéricas de resistencia vemos que altas concentraciones de KCl producen una despolarización progresiva del potencial de membrana, pero en estos vasos la NA también produce despolarización y contracción.

La mayor evidencia a favor de que los ROCs son distintos e independientes de los VOCs la aportan los experimentos donde se midieron la tensión desarrollada y la entrada de ^{45}Ca (KHALIL y cols. 1987), así como los datos electrofisiológicos, en arterias estimuladas por un agonista:

1) En primer lugar, la NA puede incrementar la entrada de ^{45}Ca y la fuerza de contracción, sin causar una despolarización substancial (DROOGMANS y cols. 1977; CAUVIN y cols. 1985).

2) La NA puede producir un aumento de la tensión y de la entrada de Ca en la arteria aorta previamente estimulada por alto KCl, sin causar una mayor despolarización (CAUVIN y cols. 1984; BULBRING y TOMITA, 1987).

3) La entrada de Ca en respuesta a la aplicación simultánea de alto KCl y NA, aproximadamente es la suma de la producida por los agentes por separado (MEISHERI y cols. 1981; VAN BREEMEN, 1986).

4) Por último, la entrada de Ca en respuesta a la NA en la arteria aorta es menos sensible a los Aca que la

entrada inducida por despolarización (CAUVIN y cols. 1983; YAMAMOTO y cols. 1984).

Todos estos datos sugieren la existencia de caminos distintos de activación cuando se despolariza y cuando se administra NA u otro neurotransmisor.

Sin embargo algunos autores no excluyen la posibilidad de que la NA y otros neurotransmisores activen los VOCs (BENHAM y TSIEN 1988; NELSON y cols. 1988, 1990; PACAUD y cols. 1991); los argumentos en los que se basan son los siguientes:

1) Se ha demostrado que la NA, del mismo modo que la 5-HT, la angiotensina II y la endotelina pueden activar los VOCs sin un cambio substancial en el potencial de membrana (BENHAM y TSIEN 1988; GOTO y cols. 1989; WORLEY y cols. 1989).

2) La estimulación con alto KCl podría no llevar a una completa activación de los VOCs, de tal manera, que una contracción adicional sería esperable al añadir la NA (NELSON y cols. 1990).

3) Por la misma razón, una mayor entrada de Ca sería de esperar cuando se adicionan la NA y el KCl juntos, respecto a cuando cada uno de ellos es agregado por separado (NELSON y cols. 1990).

4) Por último, la mayor sensibilidad de los A_{Ca}, en respuesta a la despolarización de la membrana, podría ser consecuencia de la acción bloqueante de estos agentes, la

cual es dependiente de un voltaje determinado, estando favorecida la inhibición durante la despolarización (MOREL y cols. 1987; NELSON y WORLEY, 1989). Es decir, que los ACA podrían mediar una menor inhibición cuando el potencial de despolarización es más negativo, aún cuando el canal fuera el mismo en cada caso. Además, la activación por la NA de los VOCs en músculo liso arterial, podría reducir la afinidad por los ACA. Se ha comprobado que los VOCs estimulados por la NA en músculo cardíaco se transforman en relativamente insensibles a la inhibición por D-600 (McDONALD y cols. 1989).

Han sido propuestas dos hipótesis para explicar el mecanismo de acción de los VOCs por agonistas:

1) NELSON y cols. han propuesto que las contracciones inducidas por la NA en el músculo liso arterial se producen por activación directa de los VOCs por el agonista. El mecanismo consistiría en un desplazamiento de la curva de activación de los VOCs, mediada por el vasoconstrictor, hacia voltajes más negativos, de tal modo, que la probabilidad de apertura del canal (P_o) fuese mayor a un potencial de membrana dado, no siendo necesaria una despolarización para causar un incremento sustancial de la entrada de Ca a través de estos canales (BENHAM y TSIEN, 1988; NELSON y cols. 1988, 1990; WORLEY y cols. 1989). Este efecto estaría mediado por el diacilglicerol, generado durante la estimulación del receptor α -adrenérgico, el cual activaría a la proteinquinasa C (PKC) que fosforilaría a los VOCs del músculo liso arte-

rial, dando como resultado un aumento de su apertura del canal (BROWN y BIRNBAUMER, 1988; NELSON y cols. 1990). Esta hipótesis se basa en la demostración experimental de que la fosforilación de los VOCs cardíacos y esqueléticos por la PKC incrementa la apertura de dichos canales (REUTER, 1983; KAMEYAMA y cols. 1986).

2) La segunda hipótesis también propone un incremento de la entrada de Ca a través de los VOCs como respuesta al estímulo del receptor α -adrenérgico. A diferencia de la primera, se postula una activación indirecta de los canales por el agonista (PACAUD y cols. 1991). La secuencia de acontecimientos podría ser la siguiente: la NA libera Ca de los depósitos intracelulares a través del IP_1 , el Ca liberado abriría canales de Cl^- produciendo una corriente de entrada y la despolarización de la membrana plasmática, la cual produciría la entrada de Ca a través de los VOCs. Sin embargo, la naturaleza de los canales responsables de la despolarización podría diferir de un tejido a otro. En músculo liso vascular los canales de Cl^- activados por Ca parecen jugar el papel más importante.

Estos datos, junto con el hecho de que no se ha demostrado directamente la existencia de canales voltaje insensibles, sugieren que los ROCs activados por la NA y los VOCs puedan ser en realidad idénticos. Si bien, estos argumentos tampoco excluyen la posibilidad de que la NA active los ROCs independientes de los VOCs que puedan existir en algunos

tipos de músculo liso. Es posible que en el futuro, experimentos realizados con canales aislados nos demuestren que los ROCs son distintos de los VOCs de forma convincente.

4.4.5.3. IMPORTANCIA DE LA ENTRADA DE CALCIO EN LA RESPUESTA CELULAR

En los grandes vasos de conductancia (aorta, femoral) las contracciones inducidas al despolarizar la membrana con altas concentraciones de KCl se suprimen en un medio libre de calcio o tras administrar Aca, lo que indica que son debidas exclusivamente a la entrada de Ca a través de los VOCs tipo L. Por el contrario, las contracciones inducidas por diversos agonistas (NA, 5-HT, angiotensina II, tromboxano A₂) muestran dos componentes:

1. Uno inicial, componente fasico, que persiste en un medio sin Ca o tras la administración de Aca, y que sería atribuible a la liberación de IP₃ y a la movilización del Ca almacenado a nivel intracelular.
2. Otro tardío, que desaparece en un medio sin Ca y que sería debido al flujo de entrada de Ca a través de los ROCs. Los Aca suprimen sólo el componente tardío, ya que no alteran la liberación de Ca desde el retículo sarcoplásmico. Esto explica porque los Aca inhiben las contracciones inducidas al despolarizar la membrana a concentraciones de 10-1.000 veces menores que aquellas necesarias para inhibir las

inducidas por agonistas (CAUVIN y cols. 1983; GODFRAIND y cols. 1986; NAYLER, 1988).

Sin embargo, en las arterias coronarias y cerebrales y en los vasos de resistencia tanto las contracciones inducidas tras despolarización del potencial de membrana, como las inducidas por agonistas desaparecen en un medio sin Ca y son bloqueadas por los ACA, lo que indica que ambas respuestas contráctiles son debidas exclusivamente a la entrada de Ca a través de VOCs y no a la movilización de Ca intracelular (CAUVIN y cols. 1984; CAUVIN y VAN BREEMEN, 1985). Por tanto, la selectividad vascular de los ACA por los vasos coronarios, cerebrales y de resistencia es consecuencia de que el papel que juega la entrada de Ca a través de los VOCs varía en los distintos territorios vasculares.

Más aún, existen diferencias dentro de un mismo territorio vascular (CAUVIN y VAN BREEMEN, 1985; HAEUSLER y DE PEYER, 1989); según disminuye el calibre vascular la respuesta contráctil inducida por la NA cada vez depende menos de su capacidad para liberar el Ca almacenado a nivel intracelular y se hace cada vez más dependiente de la entrada de Ca a través de los VOCs. Ello explica porque los vasos de resistencia son tan sensibles a la acción de los ACA y porque estos fármacos son capaces de producir vasodilatación y reducción de la presión arterial en concentraciones con las que apenas sí modifican la contractilidad miocárdica.

5. PARTICIPACION DEL ENDOTELIO EN LA RELAJACION VASCULAR

La presencia de endotelio es imprescindible para la acción relajante vascular de la acetilcolina y otros vasodilatadores endógenos.

Este hecho fue descubierto por FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980, de un modo accidental, al utilizar la preparación de aorta de conejo aislada montada en anillos en vez de tiras helicoidales. La acetilcolina no relajaba, incluso contraía, la preparación helicoidal previamente contraída por NA; sin embargo, causaba una gran relajación de la preparación montada en anillos. Esta ausencia de relajación en las tiras helicoidales se comprobó que era debida al deterioro, no intencionado durante su preparación, de la capa íntima del vaso. Se demostró, mediante estudios farmacológicos e histológicos el requerimiento de las células endoteliales para la relajación por acetilcolina. Este hecho se ha apreciado en numerosas arterias (mesentérica, pulmonar y oreja de conejo, aorta de rata, cobayo y gato, y diversas arterias humanas, etc.) y en menor grado en venas (FURCHGOTT, 1984; FURCHGOTT y cols. 1984; CHRISTIE y cols. 1989).

La acetilcolina relaja con igual sensibilidad las contracciones producidas por distintos agonistas: noradrenalina, histamina, serotonina, angiotensina II, prostaglandina $F_{2\alpha}$ y también produce una relajación significativa de las preparaciones despolarizadas por potasio, lo cual indica que

la relajación no está relacionada con los receptores de dichos agonistas y ocurre independientemente de los cambios del potencial de membrana de las células del músculo liso (FURCHGOTT, 1984). Parece que la acetilcolina al activar un receptor muscarínico en las células endoteliales liberaría una sustancia o sustancias que difunden a las células musculares subyacentes y activan un mecanismo de relajación (BOLTON y cols. 1988). Se ha demostrado la liberación de un factor de relajación derivado o dependiente del endotelio (EDRF) mediante ingeniosas experiencias de perfusión en cascada y el montaje "sandwich". En estas experiencias una preparación "donante" con endotelio, pero que no produce cambios de tensión (tira longitudinal), causa la relajación de otra preparación "receptora" (tira transversal) sin endotelio, por la liberación de un factor relajante producido por el endotelio y liberado al medio (FURCHGOTT y BHADRAGON, 1983; FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980; GRIFFITH y cols. 1984).

La liberación de este EDRF ha demostrado ser también el responsable de la relajación causada en distintas preparaciones arteriales por otras sustancias vasoactivas: ATP, ADP, ionóforo del calcio, histamina, bradiquinina, sustancia P, serotonina, trombina, ácido araquidónico, hidralacina (FURCHGOTT, 1984; VAN de VOORDE y LEUSEN, 1983), aunque los efectos de estos agentes varían según la especie animal, el tipo de vaso estudiado y el tono vasoconstrictor previo (FÖRSTERMANN y cols. 1988; IGNARRO, 1989; ANGUS y COCKS, 1989; MARIN y SANCHEZ FERRER, 1990).

5.1. NATURALEZA QUIMICA DEL FACTOR ENDOTELIAL (EDRF).

La identidad química de este factor ha sido objeto de numerosas controversias. Se sabe que es un producto muy lábil, con una vida media de 6-50 seg dependiendo de la especie animal y de la presión parcial de oxígeno en el medio de incubación de la preparación (FURCHGOTT, 1984; GRIFFITH y cols. 1984). Inicialmente se atribuyó esta relajación dependiente del endotelio a la adenosina, al AMP o a alguna prostaglandina. Se ha estudiado la identidad del EDRF mediante las siguientes aproximaciones experimentales:

- La susceptibilidad de la relajación mediada por el endotelio a distintas condiciones y agentes inhibidores: estados de anoxia, inhibidores de la ciclooxigenasa, agentes antioxidantes, captadores de radicales libres, inhibidores de la hipoxigenasa, inhibidores de la liberación del ácido araquidónico que produce un producto metabólico, la prostaciclina (PGI_2) que actúa como vasodilatador a nivel sanguíneo (FURCHGOTT y cols. 1984; GRIFFITH y cols. 1984; VAN de VOORDE y LEUSEN, 1983; MONCADA, 1986).

- Sustancias que son producidas o estimulada su síntesis por la acción de relajantes endotelio-dependientes (AWANO y cols. 1989).

- Capacidad de los posibles factores de relajar e incrementar los niveles de GMPc dependiendo de la presencia de endotelio (FURCHGOTT y cols. 1984).

Mediante estos estudios se atribuyó la identidad del factor relajante endotelial a un producto lábil de la vía lipasa lipoxigenasa (FURCHGOTT, 1984); aunque GRIFFITH y cols. (1984) descartan estas sustancias y atribuyen la identidad de este factor a compuestos con un grupo carbonilo, sin descartar la existencia de más de un factor liberado por distintos vasodilatadores (AWANO y cols. 1989).

Por tanto, se ha sugerido que la activación de los receptores muscarínicos de las células endoteliales producen la liberación de ácido araquidónico de fosfátidos, la posterior oxidación de este ácido graso insaturado por una lipoxigenasa conduce a la formación y liberación de un intermediario activo muy inestable, posiblemente un radical libre, al que se atribuye el papel del EDRF. Esta hipótesis se relaciona con la capacidad de estimular la guanilato ciclasa por ciertos radicales libres (FURCHGOTT, 1984).

MONCADA y cols. (1987) y PALMER y cols. (1987) han atribuido al óxido nítrico (NO) el papel de EDRF. Utilizando aortas montadas en un sistema de cascada las cuales son incubadas con el perfundido de células endoteliales cultivadas. Han comprobado que el NO tiene las mismas propiedades biológicas que el EDRF: es liberado por las células endoteliales, es inhibido por la hemoglobina, es inestable, su vida media es incrementada por la presencia de captadores de radicales libres (superóxido dismutasa) y produce la acumulación de GMPc y la relajación vascular.

El óxido nítrico presenta también propiedades a nivel plaquetario semejantes al EDRF; inhibe la agregación y la adhesión plaquetaria y tiene también propiedades desagregantes (AWANO y cols. 1989; MONCADA y cols. 1988).

El óxido nítrico se muestra, por tanto como un segundo mensajero (nitrato endógeno) que media la relajación producida por numerosos compuestos. Anteriormente ya se sugirió que la acción de los vasodilatadores nitrogenados se debía a los iones nitrilo o a intermediarios que contienen óxido nítrico, el cual produce un incremento de los niveles de GMPC (IGNARRO y KADOWITZ, 1985) y detectados por técnicas de binding (WALDMAN y MURAD, 1988).

MONCADA y cols. (1987) sugieren que pueden ser liberados distintos EDRF "in vitro", ya que un sólo factor, y en particular el óxido nítrico, no puede explicar todas las relajaciones dependientes del endotelio (AWANO y cols. 1989; VANHOUTTE, 1988).

5.2. TRASCENDENCIA FISIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA.

La importancia del endotelio, apreciada en las experiencias "in vitro", se ha intentado comprobar en preparaciones "in vivo" para estudiar su importancia fisiológica. Se ha conseguido la relajación dependiente del endotelio mediante la aplicación de acetilcolina por infusión intraarterial y también por aplicación en la superficie de la capa adventi-

cia, en este último caso con mucha menor potencia. Se ha realizado tanto en grandes arterias como en las pequeñas, de resistencia y puede tener importancia fisiológica en la actuación de las sustancias que se liberan en el torrente sanguíneo, pero resulta más difícil explicar su participación para las sustancias, como la acetilcolina, que son liberadas en las terminaciones nerviosas próximas a la capa adventicia (FURCHGOTT y cols. 1984).

Un daño en el endotelio puede producir una mayor sensibilidad y respuesta a los agentes agonistas alfa y a angiotensina II, lo cual produce una hiperactividad vascular (BULLOCH y cols. 1986). Además, como hemos indicado anteriormente, distintos fármacos (nitrovasodilatadores, bloqueantes de la entrada de Ca, etc.) pueden ver potenciada o disminuida su acción por la mayor o menor integridad de la capa endotelial (VANHOUTTE, 1988).

La ausencia de este factor relajante puede participar en la génesis de espasmos coronarios. Se sugiere, que en condiciones patológicas se reduce la capacidad de liberación de EDRF, e incluso se pueden generar sustancias vasoconstrictoras (MONCADA y cols. 1987). LANGILLE y O'DONNELL (1986) han observado una disminución del diámetro de arterias, de modo endotelio-dependientes, en vasos con un flujo sanguíneo reducido, esto sugiere que el endotelio detecta cambios en el flujo y participa tanto en el ajuste del tono como en la modificación estructural de la pared vascular.

VANHOUTTE y cols. en 1986 estableció que las células endoteliales podían también producir factores contractores, por ello es necesario que al estudiar las respuestas dependientes del endotelio en vasos sanguíneos hipertensos es necesario considerar tanto una menor producción de EDRF como una formación acelerada de factores contractores. Una vez que se libera el factor contractor derivado del endotelio, la respuesta constrictora predomina aunque se libere continuamente EDRF. Esto podría implicar que, en situaciones patológicas, la producción del factor o factores contractores puede ser fundamentalmente más importante que la menor liberación de EDRF. El desarrollo de la arteriosclerosis puede estar relacionado con una destrucción del endotelio. El EDRF junto con la prostaciclina pueden tener un importante papel en el control de la acumulación plaquetaria en la pared vascular, así como en la regulación de la proliferación del músculo liso y metabolismo del colesterol en los vasos sanguíneos (MONCADA y cols. 1987). MONCADA y PALMER (1990) sugieren, en humano, que la formación constante de óxido nítrico por el vaso sería necesario para el mantenimiento del tono vasodilatador y el normal funcionamiento del sistema cardiovascular.

Por todo ello, el papel del endotelio en la mediación de la relajación de los vasos sanguíneos tanto por agentes exógenos como endógenos y en el control del tono vascular, es un importante factor a considerar en los mecanismos fisiológicos, farmacológicos y también probablemente de ciertos desórdenes patológicos circulatorios.

MATERIAL Y METODOS

1. ESTUDIOS EN AORTA DE CONEJO

1.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado como animales de experimentación conejos New Zealand machos, de pesos comprendidos entre 2-2,5 kg, que fueron suministrados por la casa Alin S.A.

Los conejos se sacrificaron mediante un golpe en la nuca y decapitación posterior. Seguidamente se procedía a la extracción de la aorta torácica que se colocaba en una placa de Petri que contenía solución de Krebs a 4°C de temperatura, en la que burbujeaba carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Dentro de la placa se limpiaba cuidadosamente la aorta de grasas y adherencias y posteriormente se seccionaba en anillos de aproximadamente 3-5 mm de anchura. Por la luz de los anillos se introducían dos alambres finos de acero inoxidable, rígidos, uno de los cuales se fijaba a la parte inferior del baño y el otro, se desplazaba paralelamente al anterior, uniéndose a un transductor fuerza-desplazamiento que a su vez estaba conectado a un polígrafo en el que se registraron los cambios de tensión. Tras su montaje, las preparaciones se introducían en copas de Allhin modificadas que contenían 10 ml de solución Krebs, mantenido continuamente a 37°C y burbujeada constantemente con carbógeno, lo cual daba un pH resultante comprendido entre 7,3 y 7,4.

Un esquema simplificado del equipo utilizado en la realización de nuestros experimentos se muestra en la figura 6.

A los anillos arteriales se les aplicó una tensión inicial de 2 g, reajustándose esta tensión inicial cuando se cambiaba el líquido de las copas. Las aortas se dejaban estabilizar durante un período de 2 horas antes de iniciar cada experimento, realizándose lavados de las preparaciones durante este período a intervalos de 15-20 minutos.

1.2. MANTENIMIENTO DE LAS PREPARACIONES.

Para el mantenimiento de las preparaciones hemos utilizado 8 copas de Allhin modificadas de 10 ml de capacidad. Estas copas poseen como característica principal una doble pared de vidrio, la cual forma parte de un circuito cerrado por cuyo interior circula agua caliente a una temperatura constante de 37°C en todo su recorrido, gracias a un dispositivo que actúa como bomba y termostato al mismo tiempo (Ultra Thermostat KS Colora).

La oxigenación de las preparaciones se realizó mediante una mezcla carbógena (Sociedad Española de Oxígeno, S.A.), cuya composición era 95% O₂ y 5% CO₂. La oxigenación se lograba mediante un burbujeo continuo de la mezcla carbógena en el seno del líquido nutricional, a través de un dispositivo situado en la parte inferior de las copas. El lavado de las

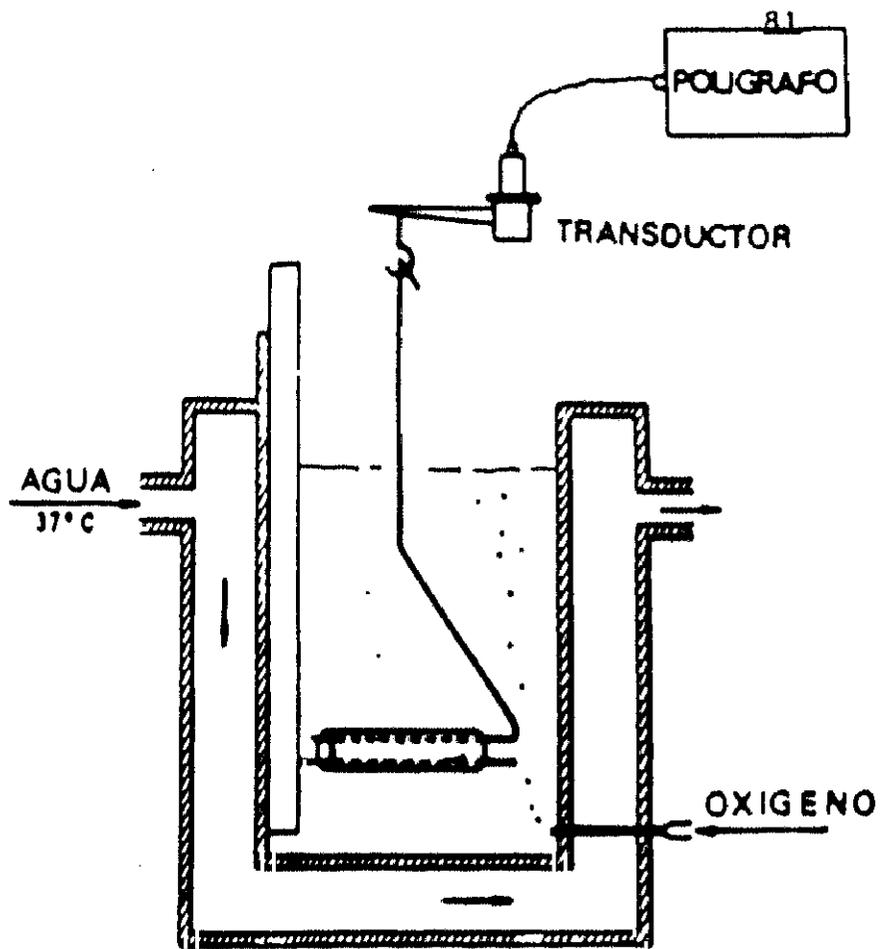


FIGURA 6

Esquema del sistema de registro y mantenimiento de la preparación.

preparaciones se realizó por el sistema de aspiración conectado en la parte inferior de las copas.

1.3. SISTEMA DE REGISTRO.

En los anillos de aorta el registro de la fuerza contráctil se realizaba: a) en un polígrafo GRASS modelo 7 de cuatro canales a través de transductores fuerza-desplazamiento GRASS FT03. Este polígrafo permitía efectuar los registros de las contracciones con velocidades de salida del papel comprendidas entre 2,5 mm/minuto y 100 mm/segundo. b) En un polígrafo Omniscrite D5000 o en un Letica poly-graph 2000, ambos de 2 canales, a través de transductores fuerza-desplazamiento, Panlab UF-1 y Letica respectivamente.

2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

Una vez estabilizadas las preparaciones, se realizaron los siguientes diseños experimentales:

2.1. ANILLOS DE AORTA.

En el primer grupo de experimentos, los anillos de aorta eran sometidos a la acción de una dosis única de noradrenalina (NA, 10^{-6} M) o KCl (80 mM). Las concentraciones utilizadas de cada agonista eran concentraciones submáximas, elegidas

en experimentos preliminares con el fin de producir respuestas contráctiles aproximadamente equipotentes. En cada experimento sólo se ensayaba uno de los agonistas. Las respuestas control para cada agonista fueron obtenidas a intervalos de al menos 30 minutos, y no se comenzaba el experimento hasta que no hubiese dos sucesivas respuestas contráctiles control idénticas. A continuación los agonistas se eliminaban del baño mediante sucesivos lavados con solución de Krebs libre de fármaco. Después se repetía el mismo diseño experimental, pero en esta ocasión se adicionaba a la copa la concentración deseada de buscopán o alginor, 20 min y 30 min respectivamente antes de añadir el agonista empleado (NA ó KCl).

Estos experimentos nos permiten apreciar la acción del alginor tanto sobre la respuesta inicial fásica como sobre la tónica.

En un segundo grupo de experimentos, los anillos de aorta eran contraídos con dosis submáximas de NA (10^{-6} M) o KCl (80 mM). Una vez obtenida la respuesta contráctil máxima con cada uno de los agonistas, se añadían al baño dosis progresivamente crecientes y acumulativas de buscopán o alginor para determinar si estos fármacos podían relajar las contracciones ya establecidas. Antes de la siguiente adición de cada uno de estos fármacos se esperaba el tiempo suficiente para que la dosis previa ejerciese su efecto máximo.

Recientemente se ha suscitado un gran interés por la participación del endotelio en el control del tono vascular (FURCHGOTT y cols. 1984; MARTIN y cols. 1985). Así, se atribuye a esta capa de la pared vascular actividades relajantes y contracturantes que modulan el tono de los vasos. Distintos vasodilatadores producen una relajación mediada por endotelio. La destrucción o degradación de esta capa endotelial podría contribuir a la distinta reactividad de los vasos observada en determinadas situaciones patológicas. Por ello, resulta de gran interés estudiar la influencia del endotelio en la acción contráctil y relajante de sustancias endógenas y exógenas, en nuestro caso la acción vasodilatadora del alginor.

Así, en un tercer y cuarto grupo de experimentos se procedió a la eliminación del endotelio tras la introducción en la luz vascular de un vástago de madera tal como describieron originalmente FURCHGOTT y ZAWADKI (1980). La eliminación del endotelio vascular se confirmaba antes de iniciar cada experimento observando que la acetilcolina ($10^{-6}M$) no era capaz de producir una relajación completa de las contracciones previamente inducidas por la NA ($10^{-6}M$), (MARTIN y cols. 1985, FURCHGOTT y cols. 1984).

Tras la estabilización de las aortas inducíamos la contracción con KCl (80 mM) o NA ($10^{-6}M$) que producía una contracción fásica, la cual alcanza un nivel tónico; a los

10 min lavamos las preparaciones y cuando se han relajado hasta su nivel basal volvemos a adicionar KCl o NA. Tras la obtención de dos respuestas contráctiles semejantes, se incuban las preparaciones con alginor (10^{-15}M - 10^{-9}M) durante 20 min previamente a la adición de KCl o NA.

En un cuarto grupo de experimentos, tras la estabilización de los anillos de aorta se adicionaba KCl (80 mM) o NA (10^{-6}M). Una vez obtenida la respuesta contráctil máxima con cada uno de los agonistas se adicionaba al baño dosis progresivamente crecientes y acumulativas de alginor. Las dosis de alginor (10^{-14}M - 10^{-6}M) eran adicionadas cada 20 min. El grado de relajación se expresaba como porcentaje de cambio con respecto a la máxima contracción obtenida por la adición de KCl.

En un quinto grupo de experimentos, los anillos de aorta de conejo se equilibraban durante 2 horas en solución nutritiva carente de Ca que contenía EGTA Na_2 (0.1 mM). Durante estas dos horas se lavaban las preparaciones con esta solución cada 20 min. Tras este periodo de equilibrio, los anillos de aorta se perfundían con solución nutritiva 0-Ca hiperpotásica (KCl 80 mM) y al cabo de 5 min la concentración extracelular de Ca se incrementaba progresivamente de 1-5 mM durante los siguientes 45 min (TAMARGO y cols. 1978; GOD-FRAIND y cols. 1982; BARRIGON y cols. 1984, 1985; TEJERINA y TAMARGO, 1992). Este procedimiento permitía obtener una

curva dosis-respuesta al Ca en estas preparaciones despolarizadas. Una vez obtenidas las curvas control, los anillos de aorta se lavaban con solución nutriticia 0-Ca y se reincubaban en este medio nutritivo durante 60 min. Al cabo de este tiempo se repetía el mismo diseño experimental, pero 20 min antes de la adición de Ca se añadía al baño alginor (10^{-10} M). Esto permitía estudiar el efecto del fármaco sobre la curva dosis-respuesta al Ca.

En un sexto grupo de experimentos, siguiendo el diseño experimental de HESTER y cols. (1986, 1987), los anillos de aorta intactos fueron contraídos por NA (10^{-6} M). A continuación se lavaba el agonista y las aortas se incubaban durante 15 min en líquido nutritivo 0-Ca que contenía EGTA (10^{-5} M) y D600 (10^{-5} M). Con ello se pretendía que al reexponer las preparaciones a la NA se produjera una respuesta contráctil fásica exclusivamente, que sería debida no a la entrada de Ca a través de VOC, sensibles a ACa, sino exclusivamente a la movilización de Ca desde sus depósitos intracelulares. En la segunda parte del experimento, después de obtener la respuesta contráctil a la NA (en líquido nutritivo), lavamos los anillos con solución nutritiva 0-Ca + EGTA + D600 y añadimos la concentración deseada de buscopán (10^{-6} M) 30 min antes de reañadir la NA (HESTER, 1987).

En un último grupo de experimentos, siguiendo el diseño experimental propuesto por HESTER y cols. (1986), inducíamos una respuesta contráctil con NA (10^{-6} M) en líquido nutritivo

y a continuación se incubaban los anillos en líquido nutritivo $0\text{-Ca} + \text{EGTA} (0,01 \text{ mM}) + \text{D600} (10^{-5}\text{M})$. En estas condiciones, al reañadir NA al baño se producía una respuesta fásica que desaparecía rápidamente. Pero si en estas condiciones incrementábamos la $[\text{Ca}]_0$ a 2 mM , se producía un incremento de la fuerza contráctil que alcanzaba valores estables al cabo de 5 min , puesto que en el baño aún existe NA, esta respuesta contráctil reproducía el componente tónico de este agonista. Este mismo procedimiento experimental se reproducía en iguales condiciones añadiendo nuestro fármaco, buscopán ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) previa incubación durante 30 min .

3. DETERMINACION DE LOS FLUJOS DE ^{45}Ca EN ANILLOS DE AORTA.

3.1. JUSTIFICACION DE LOS METODOS.

La determinación de los flujos de Ca utilizando isótopos radiactivos (^{45}Ca) permite obtener una determinación mas directa de las modificaciones de los movimientos de Ca producidos por los distintos fármacos, durante la contracción y la relajación de los músculos lisos. Podemos, además, relacionar los efectos contráctiles o relajantes observados en las experiencias de registro de tensión contráctil con los flujos de entrada de Ca, lo que proporciona una valiosa información para la comprensión del mecanismo de acción de los fármacos a nivel del Ca.

La metodología de los marcadores radiactivos constituye una técnica de detección de gran sensibilidad, ya que la medida de las radiaciones emitidas por un radionúclido permite el recuento de los átomos radiactivos pese a su pequeña masa. Los radioisótopos son indistinguibles químicamente de los respectivos elementos estables; por tanto, pueden distribuirse en toda la preparación hasta alcanzar un equilibrio entre las concentraciones intra y extracelulares del catión marcado y el no marcado. De este modo podemos detectar las variaciones de los niveles del catión por la acción de los distintos fármacos, es decir, su acción a nivel de los movimientos del Ca.

En esta Tesis Doctoral hemos determinado los flujos de entrada de ^{45}Ca en la aorta torácica de conejo, las modificaciones de dichos flujos por la acción de la NA y KCl, así como la acción de buscopán y alginor sobre los flujos basales y estimulados por los agonistas mencionados.

El estudio de los flujos de Ca a través de la membrana celular se realiza mediante la detección de la desaparición o incorporación del isótopo ^{45}Ca a la preparación muscular. Este estudio ha estado limitado por la gran cantidad de Ca extracelular, ya que en el músculo liso el 90% del Ca tisular se encuentra distribuido por el espacio extracelular bien en forma ligada o libre. Para poder detectar el Ca intracelular se ha de utilizar un procedimiento que evite la interferencia del Ca del exterior.

VAN BREEMEN y cols. (1972) propusieron el método del lantano para "atrapar" el Ca dentro de la célula, es decir, el lantano bloquea los flujos a través de la membrana y desplaza el Ca de sus lugares de unión extracelulares. Otra condición necesaria para la validez de este método, es que el lantano no atraviese la membrana celular (SANGUINETTI y JURKIEWICZ, 1990). Sin embargo, se ha mostrado que el lantano, en estas condiciones, puede penetrar en algunas preparaciones desplazando fracciones de Ca intracelular e incrementando la salida de Ca (TEJERINA y cols. 1988; TAMARGO y TEJERINA, 1989). Se ha descrito que la pérdida de ^{45}Ca del tejido está relacionada con la concentración de lantano; los minutos iniciales, la solución de lantano desplaza el Ca extracelular y posteriormente parte del Ca intracelular.

KARAKI y WEISS (1979) han modificado esta metodología utilizando una solución de lantano con concentraciones superiores (74 mM) mantenida a $0,5^{\circ}\text{C}$ a fin de reducir al mínimo las pérdidas de Ca. Los estudios de captación o entrada de Ca realizados por este método del lantano, se expresan como captación o entrada de Ca no desplazable por el lantano (resistente a dicho catión), ya que se determina el contenido de ^{45}Ca tras un largo periodo de lavado en una solución con lantano.

Se ha investigado la utilización de otras soluciones que eliminen la interferencia del Ca extracelular evitando, además, las pérdidas de Ca celular. Estas soluciones tienen

distintas concentraciones de lantano o de agentes quelantes del Ca como EGTA. MEISHERI y cols. (1980, 1981) utilizaron una solución con 2 mM EGTA a 0°C con la cual obtienen una mejor retención de Ca celular que con el método del lantano. Además, este método no vacía los depósitos intracelulares de Ca sensibles a los agonistas.

Es importante, además de la elección de la solución quelante del Ca extracelular, la obtención de la preparación muscular sin causarle ningún tipo de daño durante el procedimiento de limpieza. El deterioro de la preparación puede causar grandes captaciones de ^{45}Ca que darían lugar a una estimación excesiva y errónea de la entrada de Ca.

3.2. DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD.

La medida de la actividad de la preparación marcada con ^{45}Ca se realiza utilizando un detector de centelleo líquido. El ^{45}Ca es un núclido radiactivo que se desintegra espontáneamente emitiendo partículas β con una vida media de 164 días.

Los detectores de centelleo líquido se basan en la propiedad de ciertas sustancias (centelleadores) para transformar la energía radiactiva en luminosa.

La partícula β interacciona con las moléculas de solvente produciendo el desprendimiento de electrones, los cuales pueden ceder su energía cinética a otros electrones de átomos vecinos. Se produce, de este modo, una transferen-

cia de energía desde las moléculas de los solventes a las del centelleador, el cual la reemite en forma de destellos. Los fotones emitidos por el líquido centelleador son captados por un fotomultiplicador que transforma las señales luminosas en impulsos eléctricos (figura 7). Los contadores de centelleo líquido expresan la actividad radiactiva en cuentas por minuto (cpm); esta es la actividad medida o aparente y no coincide con la actividad absoluta o real (desintegraciones por minuto (dpm)), ya que dichos detectores sólo cuentan una fracción de las radiaciones emitidas, por existir pérdidas debidas a la instrumentalización y a la extinción. Dicha fracción es la eficiencia o rendimiento de c contaje:

$$R = \frac{\text{Actividad aparente (cpm)}}{\text{Actividad absoluta (dpm)}}$$

Ademas, existen fenómenos de extinción, los cuales interfieren con la conversión de la energía de las partículas β al líquido de centelleo o con la transmisión de dicha luz (figura 7). Por lo cual, la cantidad de destellos que alcanzan el fotomultiplicador es menor, reduciéndose la eficiencia del contaje.

Se deben de evitar al máximo las circunstancias que producen fenómenos de extinción (color, suciedad en las

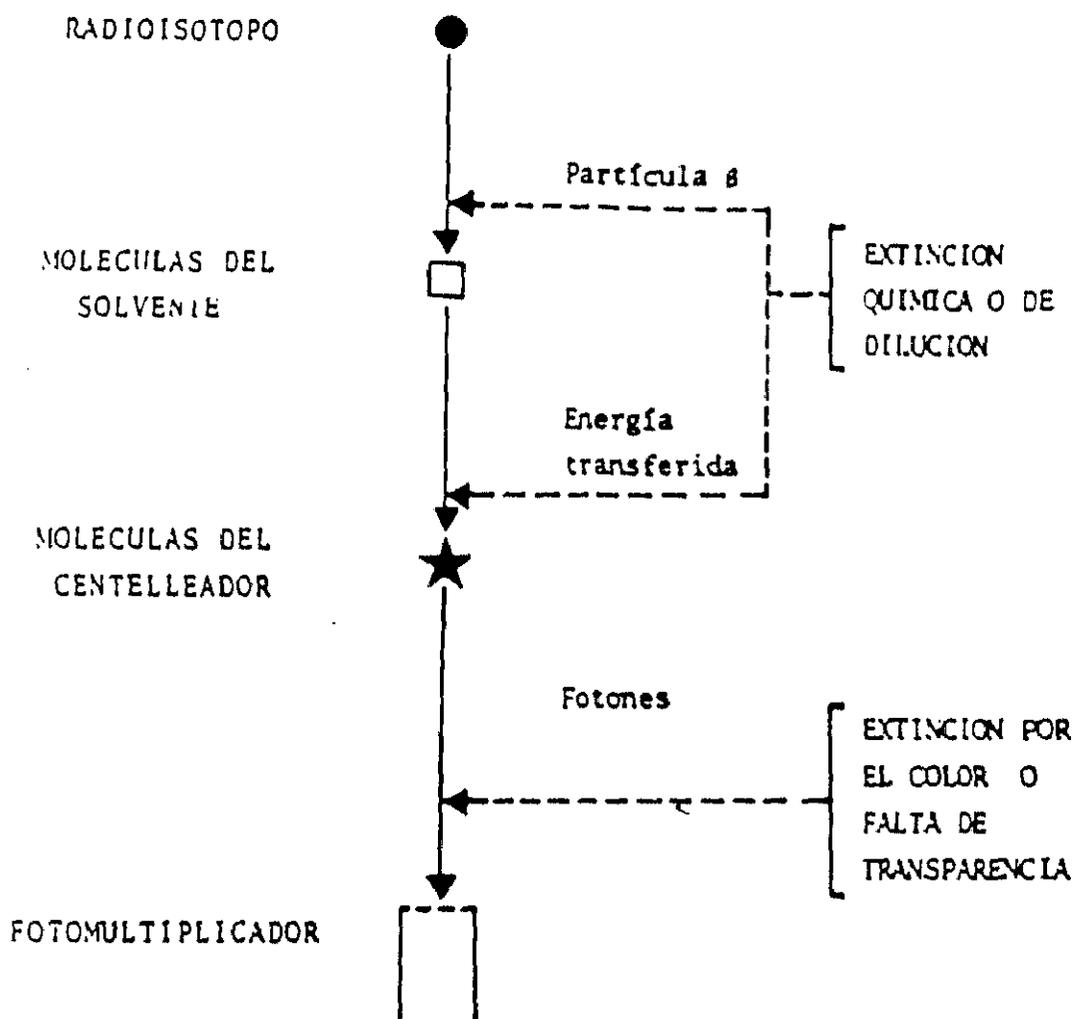


FIGURA 7

Esquema de la conversión de la energía de la partícula B a luz. Fundamento del conteo por centelleo líquido.

muestras o viales, compuestos que absorben la energía, etc.). Utilizamos, además, viales de borosilicato de sodio con bajo fondo radiactivo. Es conveniente realizar junto a la medición de los viales la de un vial blanco o fondo, y restar las cuentas de este vial al resto de los viales.

Para conocer la eficiencia del aparato se puede utilizar el método de corrección de la extinción por el patrón interno. Nosotros utilizamos un método aproximado basado en relacionar la actividad de la preparación con la actividad específica del medio de incubación marcado.

3.3. DETERMINACION DEL FLUJO DE ENTRADA DE ^{45}Ca .

Los experimentos se realizaron en anillos de aorta de unos 5 mm de anchura y en todos ellos el 50% de los anillos obtenidos se utilizaban como preparaciones control y la otra mitad como preparaciones experimentales. Tras el montaje de las preparaciones, éstas se incubaban durante 90 min en una solución nutritiva (SN) cuya composición (mM) era: NaCl, 140; Cl_2Ca , 1,5; MgCl_2 , 1.0; KCl, 4,6; glucosa, 10; Hepes 5.0 (pH = 7.2). La solución se oxigenaba con 100% O_2 y se mantenía a 37°C a lo largo del experimento. Al cabo de este tiempo a las preparaciones experimentales se las pretrataba durante 20 y 30 min con la concentración del fármaco objeto de estudio y a continuación tanto las preparaciones control, como las experimentales, se trataban con el agonista (NA, 10^{-6}M ó

KCl 80 mM) deseado y ^{45}Ca (actividad específica $2\mu\text{Ci/ml}$) durante 90 min. Al cabo de este tiempo sacamos la preparación del baño y la sumergimos en PSS-0 Ca + 2 mM EGTA a 0°C para eliminar la radiactividad adherida a la superficie de la preparación; en esta solución se mantienen las aortas durante 40 min burbujeadas con O_2 , tras los cuales se procede a la preparación de las muestras para su contaje radiactivo.

3.4. PREPARACION DE LAS AORTAS PARA EL CONTAJE RADIATIVO.

Al finalizar el experimento, los anillos de aorta se colocaban entre dos láminas de papel de filtro seco y se sometían a una presión constante de 300 gramos durante 1.5 minutos. A continuación se introducían en viales de borosilicato de sodio para contaje radiactivo y se determinaban sus pesos, por diferencia, en una balanza METTLER modelo H64. El resultado así obtenido se denominaba peso húmedo ("wet weight") (MEINERTZ y cols. 1973a,b).

A continuación se añadían a los viales de contaje 500 μl de solueno-350, dejándolos en estufa a 50°C durante un periodo de 12 horas. Los viales se cerraban herméticamente para evitar la coloración de las muestras. Tras la completa digestión de las preparaciones éstas se e decoloraban añadiendo a cada vial 200 μl de isopropanol y 200 μl de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes, manteniéndolos a temperatura ambiente durante 20 minutos para posteriormente

incubarlos en estufa a 50°C durante 45 minutos.

Para neutralizar la alcalinidad de la solución obtenida, debida fundamentalmente al solubilizador, se añadían 20 μ l de ácido acético glacial. Finalmente, se adicionaban 10 ml de líquido de centelleo y se agitaba, quedando ya las preparaciones dispuestas para el contaje radiactivo.

Por otro lado, al final de cada experimento se tomaban también una o varias muestras de 500 μ l de solución marcada con ^{45}Ca que bañaba las preparaciones, tanto controles como experimentales, con el fin de poder comparar la radiactividad hallada en el tejido con la existente en el líquido nutricio. A estas muestras se añadían 500 μ l de agua destilada y 10 ml de líquido de centelleo.

3.5. LIQUIDO DE CENTELLEO.

El líquido de centelleo utilizado para el contaje de las muestras radiactivas estaba compuesto por tolueno como disolvente, 2,5-difeniloxazol (PPO) como centelleador e iso-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Tritón X-100) como agente surfactante. En su preparación mezclábamos tolueno con Tritón X-100 en proporción 2:1 (volumen/volumen) y añadíamos 4 gramos de PPO por cada litro de mezcla. El líquido de centelleo se conservaba hasta el momento de su utilización en un barril de acero inoxidable, protegido de la luz y en lugar fresco.

3.6. TECNICA DE MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD.

Los viales utilizados para el contaje de la radiactividad contenida en las preparaciones eran de borosilicato de sodio, de escaso contenido en potasio y, en consecuencia, de bajo fondo radiactivo, con una capacidad de 20 ml. En todas las determinaciones se utilizaba un vial que no contenía radiactividad (vial fondo). El contaje se realizaba en un contador de centelleo líquido LKB Wallac 1112 Rack, de modo automático y con un tiempo de contaje de 20 minutos. La radiactividad determinada en el vial fondo era restada de todos y cada uno de los viales de los experimentos de modo automático.

3.7. CALCULO DEL FLUJO DE ENTRADA DE ^{45}Ca .

El flujo de entrada aparente de ^{45}Ca se define como la cantidad de Ca tomada por el tejido basada en la comparación de la radiactividad hallada en el tejido y la radiactividad presente en el líquido nutricio (GROSSMAN y FURCHGOTT, 1964a), y se expresa en mmol Ca/kg peso húmedo.

Para calcular este parámetro hemos utilizado la siguiente fórmula, similar a la empleada por GROSSMAN y FURCHGOTT (1964a,b), GODFRAIND (1976), GODFRAIND y DIEU (1981) y GODFRAIND y MILLER (1983):

$$\text{Contenido de calcio (mM Ca/kg)} = \frac{A(\text{dpm}) \times \text{mM (mmol Ca/l)}}{\text{AEm(dpm/l)} \times P \text{ (kg)}}$$

donde:

A = actividad de la aorta en dpm

Mm = mmoles de Ca^{2+} por litro del medio de incubación

P = peso de la aorta en kg

AEm = actividad específica del medio de dpm/litro.

4. FARMACOS Y PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS.

4.1. LIQUIDOS NUTRICIOS.

La composición de la solución de Krebs utilizada como líquido nutricio en nuestros experimentos era (mM):

NaCl	115
KCl	4.6
CaCl ₂	2.5
KH ₂ PO ₄	1.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.2
NaHCO ₃	2.5
Glucosa	11.1

Todas estas productos procedían de la casa MERCK y eran de la máxima pureza.

En algunos experimentos utilizamos solución de Krebs 0-Ca. La composición de esta solución era la misma que la del

Krebs normal, pero en ella se omitía el CaCl_2 , y se añadía EGTA (10^{-4}M) con el fin de quelar las posibles trazas de Ca del medio.

4.2. FARMACOS UTILIZADOS.

En nuestros experimentos hemos utilizado los siguientes fármacos y reactivos: N-butil bromuro de hioscina (buscopán), N-ciclopropilmetil bromuro de escopolamina (alginor), bitartrato de noradrenalina (NA, Sigma), cloruro de potasio (Merck), cloruro de Ca (Merck), etilen glicol-bis(β -aminoacetil ester) N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA, Sigma), ^{45}Ca en solución acuosa de CaCl_2 (Radiochemical Centre, Amersham), solueno-350 (Parckard), peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes (Merck), isopropanol y ácido acético glacial (May-Barter),

4.3. PRODUCTOS UTILIZADOS EN LAS DETERMINACIONES DE LOS FLUJOS DE ^{45}Ca .

4.3.1. Productos radiactivos.

Hemos utilizado ^{45}Ca en forma de solución acuosa de CaCl_2 (Amersham Int., Inglaterra). Nuestra solución contenía el día de su adquisición una actividad total de 37 MBq ($1\mu\text{Ci}$) en un volumen de 0,5 ml. La actividad específica era, por tanto, de 74 MBq/ml ($2\mu\text{Ci/ml}$).

4.3.2. Productos necesarios para la preparación del líquido de centelleo.

En la preparación del líquido de centelleo hemos utilizado los siguientes productos: tolueno (Scharlan), iso-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Tritón X-100, DBH Chemicals) y 2,5-difeniloxazol (PPO, Amersham/Searle).

4.3.3. Productos necesarios para la preparación de las muestras radiactivas.

En el tratamiento y preparación de nuestras muestras para el conteo de su radiactividad hemos utilizado los siguientes productos: SOLUENO-350 (Packard), peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes (Merck), isopropanol (2-propanol, Merck) y ácido acético glacial (May-Barter).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En esta Tesis Doctoral los datos experimentales se representan como media \pm error estándar de la misma ($\bar{x} \pm$ E.S.M.) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación de las medias se realizó utilizando el test de Student para datos apareados y no apareados, considerándose significativas aquellas diferencias en las que $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. EXPERIMENTOS EN MEDIO CON CALCIO.

1.1. EFECTOS DE BUSCOPÁN Y ALGINOR SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR POTASIO.

La contracción por despolarización con potasio se utiliza para estudiar la acción de los fármacos a nivel de la entrada de Ca por los canales voltaje-dependientes, tipo -L. En este grupo de experimentos, tras el periodo de equilibrio, las preparaciones se contraían por concentraciones submáximas de KCl (80 mM). La adición del agonista se realizaba a intervalos de 60 minutos hasta que se obtenían dos respuestas contráctiles de similar amplitud. A continuación se procedía a la adicción de la concentración deseada de buscopán ó alginor al baño 20 min antes de reexponer las preparaciones al agonista.

En la figura 8 y tabla V, se muestran los efectos de la buscopán sobre el desarrollo temporal de las respuestas contráctiles inducidas por 80 mM KCl. En 15 experimentos, la buscopán, 10^{-6} M- 5×10^{-4} M, producía una depresión concentración-dependiente de la respuesta contráctil que era claramente manifiesta con concentraciones $\geq 10^{-4}$ M. En cualquier caso es evidente en la figura 8 que el IC_{50} de la buscopán frente a las contracciones inducidas por el KCl era superior a la dosis más alta ensayada (5×10^{-4} M).

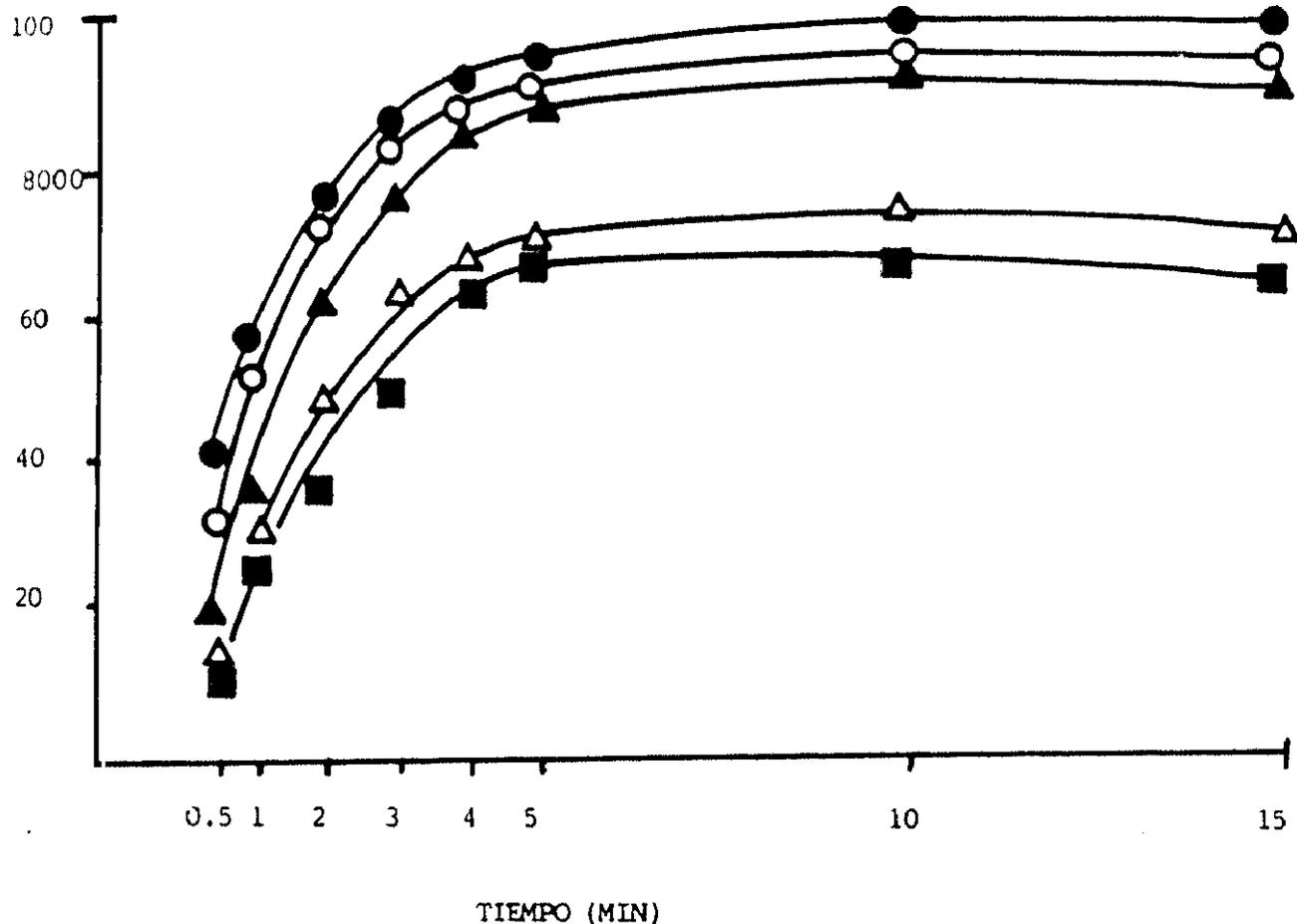


Figura 8.- Efectos de la BUS sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: tiempo en minutos. Cada punto representa la media de 15 experimentos.

(●) Control. (○) $10^{-6}M$. (▲) $10^{-5}M$. (△) $10^{-4}M$.
 (■) $5 \times 10^{-4}M$.

TABLA V .- Efecto de la BUS sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo. (n = 15, $\bar{x} \pm$ e.s.m.)

	0.5	1	2	3	4	5	10	15 Min
CONTROL	41.0 \pm 4.7	57.0 \pm 5.2	76.0 \pm 2.6	87.0 \pm 2.2	92.0 \pm 1.8	45.0 \pm 1.2	97.2 \pm 1.4	100
10 ⁻⁶ M	32.0 \pm 8.0	53.0 \pm 5.0	73.0 \pm 5.5	84.0 \pm 5.8	90.0 \pm 4.3	94.0 \pm 4.7	92.0 \pm 5.0	92.0 \pm 6.5
10 ⁻⁵ M	19.0 \pm 5.5	36.0 \pm 5.4	72.0 \pm 7.4	76.0 \pm 4.9	85.0 \pm 3.9	90.0 \pm 3.6	91.0 \pm 4.2	97.0 \pm 5.6
10 ⁻⁴ M	15.5 \pm 4.8	39.4 \pm 6.2	48.5 \pm 6.3	64.3 \pm 7.5	69.0 \pm 6.3	71.0 \pm 6.1	69.0 \pm 9.6	69.0 \pm 6.5
5x10 ⁻⁴ M	12.0 \pm 3.0	27.5 \pm 4.0	36.0 \pm 5.0	55.0 \pm 4.4	64.0 \pm 4.2	68.0 \pm 4.3	66.1 \pm 4.2	65.0 \pm 4.8

Por el contrario, como puede verse en la figura 9 y en la tabla VI, el alginor (10^{-14} M- 10^{-8} M) producía una depresión concentración-dependiente de las respuestas contráctiles al KCl a todas las concentraciones ensayadas, siendo su IC_{50} ($2.5 \pm 3 \times 10^{-11}$ M) significativamente menor ($p < 0.05$) al obtenido con buscopán. Sin embargo, y a pesar de utilizar concentraciones de alginor de hasta 10^{-4} M no era posible producir una inhibición mayor del 60% de las contracciones inducidas por el KCl.

1.2. EFECTOS DE BUSCOPÁN Y ALGINOR SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA.

La NA, ha sido ampliamente utilizada para estudiar la interferencia de un fármaco vasodilatador, con las contracciones mediadas a través de la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos vasculares. La contracción inducida por NA puede descomponerse en dos componentes, uno inicial rápido (fásico), atribuido a la liberación de Ca intracelular seguido de otro componente (tónico) de desarrollo más lento, que se ha atribuido a la entrada de Ca extracelular.

En la figura 10, se muestra el curso temporal (primeros 15 min) de las respuestas contráctiles inducidas por la NA (10^{-6} M) en ausencia y en presencia de diversas concentraciones de buscopán (10^{-6} M- 5×10^{-6} M). Puede verse que la buscopán, a concentraciones $\geq 10^{-5}$ M producía una depresión concentración-

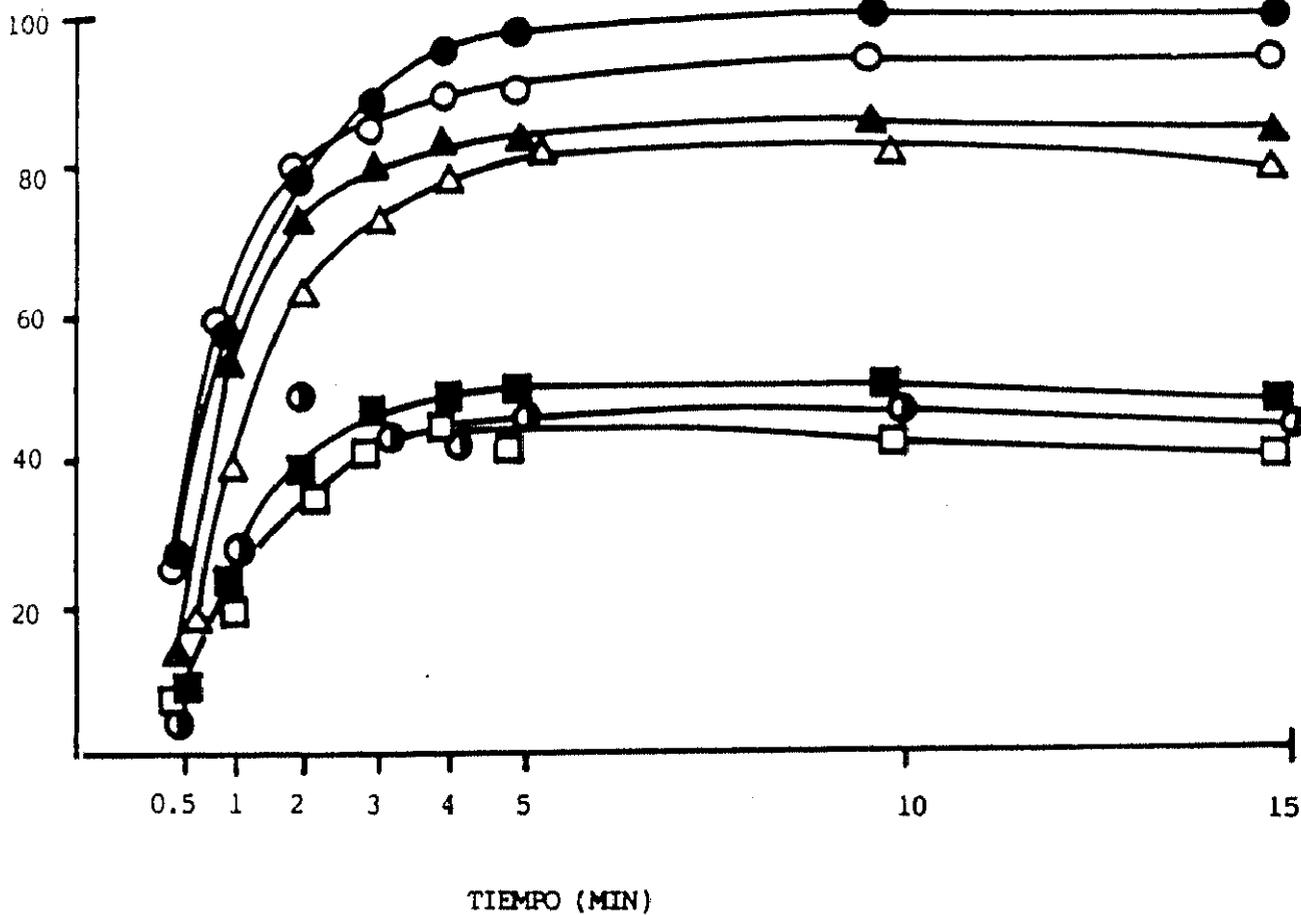


Figura 9.- Efecto del ALG sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: tiempo en minutos. Cada punto representa la media de 31 experimentos.

(●) Control. (○) 10⁻¹⁴M. (▲) 10⁻¹³M. (△) 10⁻¹²M.
 (■) 10⁻¹¹M. (◻) 10⁻⁹M. (◻) 10⁻⁸M.

TABLA VI .- Efecto del ALG sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo. (n = 31, $\bar{x} \pm$ e.s.m.)

	0.5	1	2	3	4	5	10	15 Min
CONTROL	28.2 \pm 6.7	58.4 \pm 5.3	78.8 \pm 5.8	88.0 \pm 4.0	95.4 \pm 2.8	98.0 \pm 1.8	98.3 \pm 1.2	100
10 ⁻¹⁴ M	24.0 \pm 6.5	59.0 \pm 7.0	77.0 \pm 6.5	85.0 \pm 5.7	89.5 \pm 5.0	90.0 \pm 5.0	91.0 \pm 3.2	94.0 \pm 1.0
10 ⁻¹³ M	14.0 \pm 3.5	53.0 \pm 6.0	71.0 \pm 6.0	77.0 \pm 5.0	81.0 \pm 4.0	82.0 \pm 3.6	82.5 \pm 3.0	84.0 \pm 2.0
10 ⁻¹² M	17.0 \pm 4.0	39.0 \pm 4.0	63.0 \pm 4.9	71.0 \pm 4.0	74.0 \pm 4.0	76.0 \pm 4.0	75.0 \pm 3.1	74.0 \pm 3.0
10 ⁻¹¹ M	6.5 \pm 1.6	25.2 \pm 5.0	38.0 \pm 8.0	46.0 \pm 8.8	46.0 \pm 8.8	48.0 \pm 8.8	49.0 \pm 8.5	47.5 \pm 8.0
10 ⁻¹⁰ M	8.0 \pm 1.0	20.0 \pm 5.0	36.9 \pm 8.1	41.3 \pm 9.0	48.0 \pm 9.9	45.0 \pm 9.8	44.5 \pm 9.5	41.5 \pm 9.9
10 ⁻⁹ M	7.7 \pm 1.9	23.0 \pm 5.8	35.0 \pm 8.1	40.5 \pm 9.1	44.0 \pm 9.4	43.0 \pm 9.2	43.0 \pm 8.9	43.0 \pm 8.4

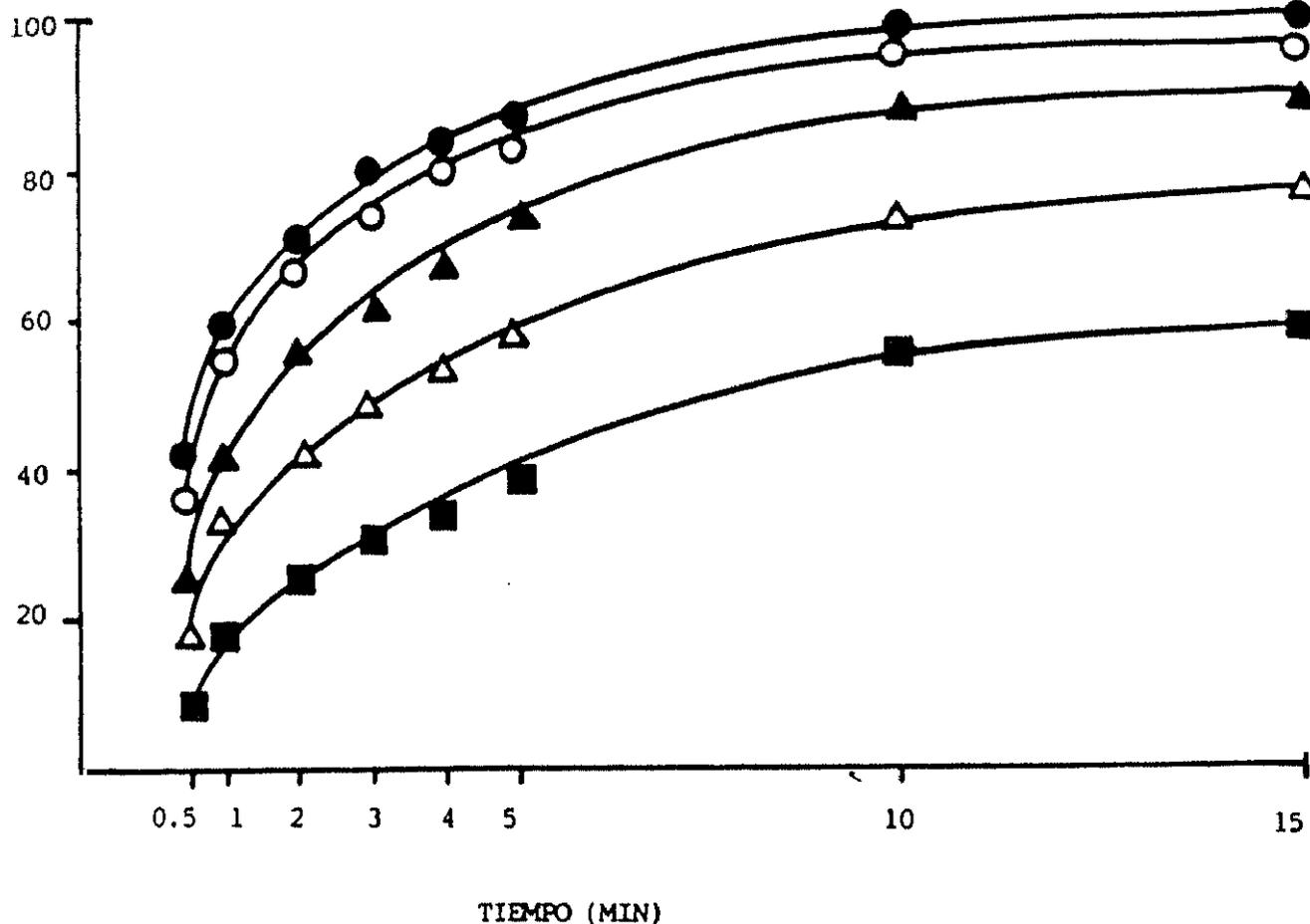


Figura 10.-Efectos de la BUS sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) ($10^{-6}M$) en anillos de aorta de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: tiempo en minutos. Cada punto representa la media de 23 experimentos.

(●) Control. (○) $10^{-6}M$. (▲) $10^{-3}M$. (△) $10^{-4}M$.
 (■) $5 \times 10^{-4}M$.

TABLA VI - Efecto de la BUS sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en anillos de aorta de conejo. (n = 23, $\bar{x} \pm$ e.s.m.)

	0.5	1	2	3	4	5	10	15 Min
CONTROL	42.0 \pm 2.4	60.0 \pm 1.7	71.0 \pm 2.5	80.0 \pm 2.0	84.0 \pm 1.8	88.0 \pm 1.8	89.0 \pm 2.0	100
10^{-6} M	37.0 \pm 2.9	56.5 \pm 2.7	68.0 \pm 1.8	75.0 \pm 1.4	80.7 \pm 1.1	85.0 \pm 1.1	90.6 \pm 1.1	97.5 \pm 2.0
10^{-5} M	25.0 \pm 2.2	42.5 \pm 3.4	56.0 \pm 3.0	72.0 \pm 3.0	67.0 \pm 3.0	74.0 \pm 3.1	81.0 \pm 2.6	90.5 \pm 3.0
10^{-4} M	18.8 \pm 2.1	33.0 \pm 2.7	42.0 \pm 3.0	49.0 \pm 2.7	53.0 \pm 3.1	57.6 \pm 3.1	62.3 \pm 2.1	77.0 \pm 3.0
5×10^{-4} M	9.0 \pm 1.1	17.0 \pm 1.7	25.3 \pm 2.0	30.0 \pm 2.2	33.6 \pm 2.5	37.6 \pm 2.5	42.0 \pm 1.6	58.0 \pm 3.0

dependiente de los componentes fásico y tónico de las contracciones inducidas por la NA, ($IC_{50} = 6.5 \pm 1.3 \times 10^{-4}M$). En la tabla VII se muestran los efectos de buscopán ($10^{-6}M - 5 \times 10^{-4}M$), obtenidos en 23 experimentos, sobre la amplitud máxima de los componentes fásico (determinado a los 30 seg de la adición del agonista al baño) y tónico (determinado a los 15 min de la adición de NA). Los valores correspondientes a ambos componentes se representan y comparan en la figura 11, observándose que los efectos de buscopán eran mucho más marcados sobre el componente inicial rápido que sobre el componente tónico.

Los efectos del alginor ($10^{-12}M-10^{-6}M$) sobre las contracciones inducidas por la NA ($10^{-6}M$) se muestran en la figura 12 y tabla VIII. El alginor, $10^{-11}M$, $10^{-8}M$ y $10^{-7}M$, produce una depresión concentración-dependiente de los componentes fásico y tónico de las contracciones inducidas por NA. Pero es evidente que el efecto depresor de alginor es menos marcado que el descrito para buscopán, siendo su IC_{50} superior a $10^{-6}M$, tanto para el componente fásico como para el tónico. La tabla VIII muestra los efectos del alginor ($10^{-12}M-10^{-6}M$), determinados en 18 experimentos, sobre la amplitud de los componentes fásico y tónico de la adición del agonista al baño.

1.3. CAPACIDAD DE BUSCOPÁN Y ALGINOR PARA RELAJAR LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR KCL.

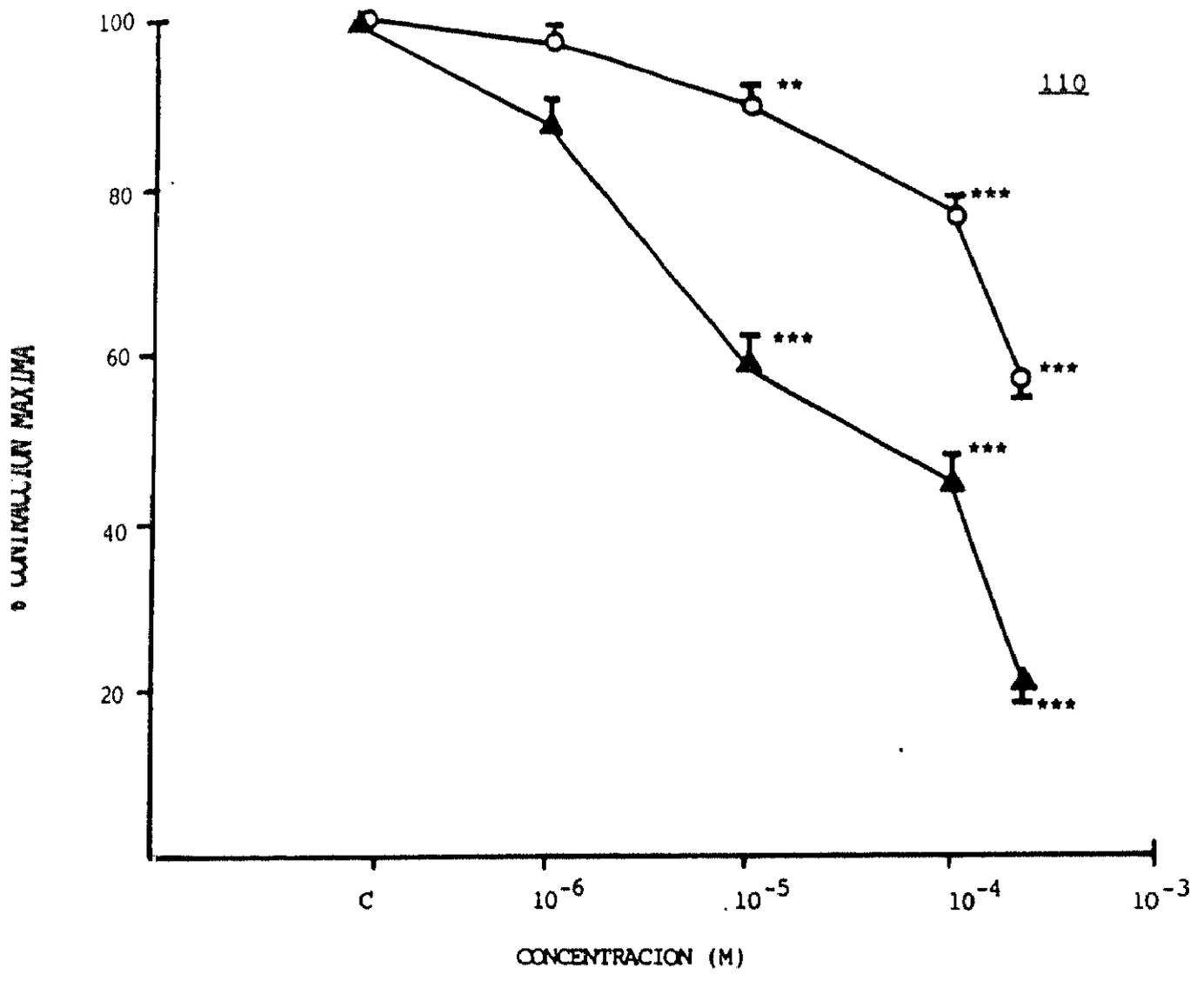


Figura 11.- Efectos de la BUS ($10^{-6}M - 5 \times 10^{-4}M$) sobre las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) ($10^{-6}M$) en anillos de aorta de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: concentración molar de BUS. Los efectos del fármaco fueron determinados a los 30 s (▲, componente físico) y a los 10 min (○, componente tónico). Cada punto representa la media de 23 experimentos.

p<0.01; *p<0.001

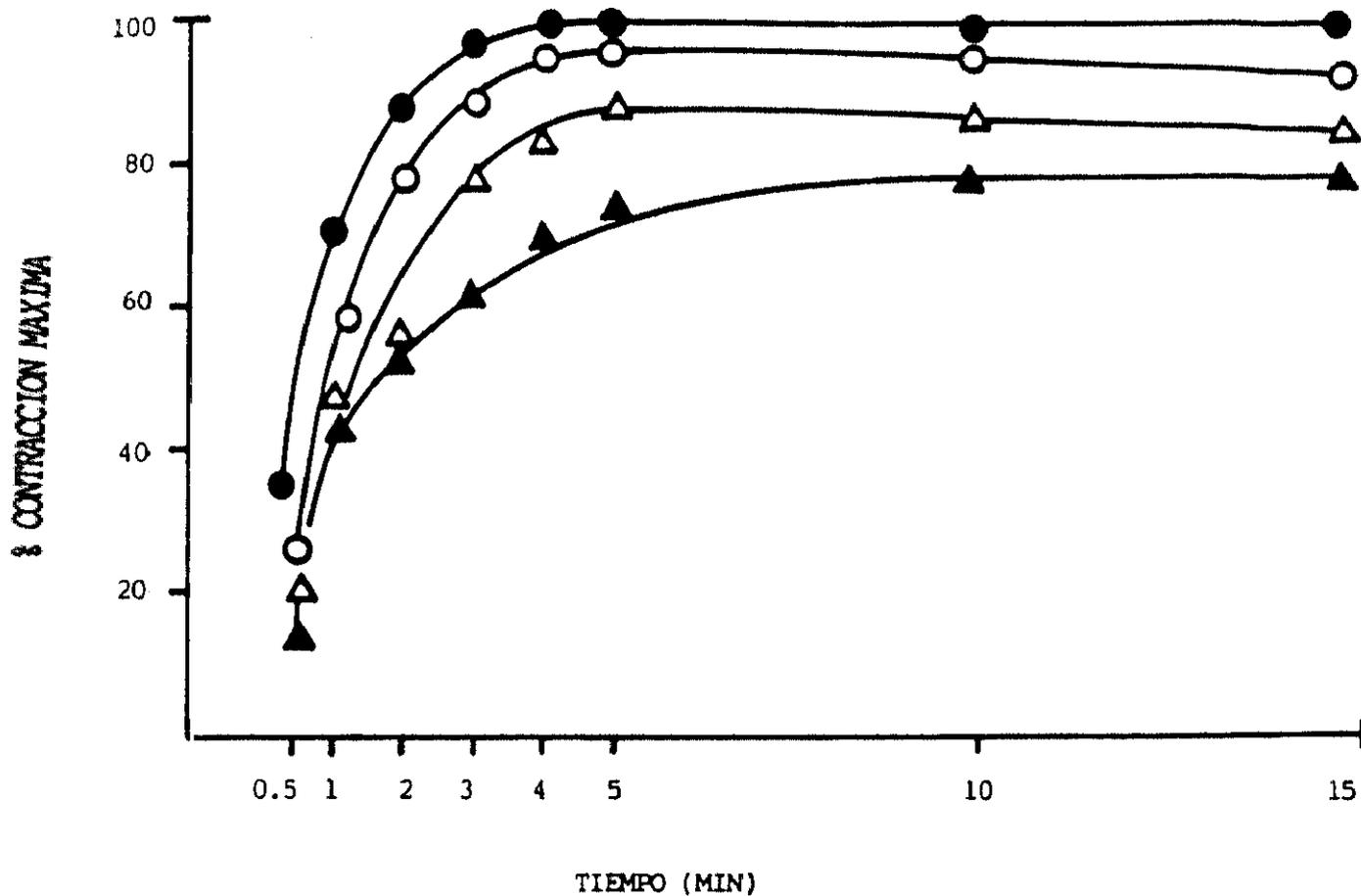


Figura 12.- Efecto del ALG sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en anillos de aorta de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: tiempo en minutos. Cada punto representa la media de 18 experimentos.

(●) Control. (○) 10^{-12} M. (△) 10^{-6} M. (▲) 10^{-7} M.

TABLA VIII.- Efecto del ALG sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en anillos de aorta de conejo. (n = 18, $\bar{x} \pm$ e.s.m.)

	0.5	1	2	3	4	5	10	15 Min
CONTROL	36.3 \pm 5.9	71.1 \pm 5.0	89.0 \pm 3.0	97.0 \pm 1.3	100	100	100	100
10^{-12} M	27.0 \pm 3.9	57.0 \pm 5.8	73.0 \pm 6.0	84.0 \pm 7.0	93.0 \pm 7.0	93.0 \pm 7.8	91.0 \pm 6.5	88.0 \pm 8.1
10^{-11} M	27.0 \pm 7.0	59.0 \pm 7.0	78.0 \pm 7.6	88.0 \pm 8.8	94.0 \pm 9.8	96.0 \pm 9.5	90.0 \pm 9.0	91.0 \pm 8.1
10^{-10} M	20.3 \pm 5.5	50.5 \pm 8.5	68.5 \pm 8.5	82.5 \pm 8.9	87.0 \pm 8.7	91.8 \pm 9.0	91.0 \pm 9.0	91.0 \pm 8.8
10^{-9} M	20.0 \pm 6.7	52.5 \pm 8.7	56.5 \pm 11.0	78.0 \pm 11.0	83.0 \pm 11.7	87.0 \pm 11.5	86.4 \pm 9.1	84.5 \pm 9.9
10^{-8} M	18.0 \pm 4.5	43.0 \pm 7.0	53.0 \pm 11.0	69.0 \pm 9.0	76.0 \pm 9.3	80.0 \pm 8.5	82.0 \pm 7.5	85.0 \pm 8.2
10^{-7} M	14.5 \pm 5.0	43.0 \pm 11.0	53.0 \pm 11.0	62.0 \pm 12.0	70.0 \pm 13.0	74.0 \pm 13.0	76.0 \pm 10.0	78.0 \pm 11.0
10^{-6} M	21.0 \pm 1.2	53.0 \pm 7.5	60.4 \pm 5.3	72.0 \pm 6.0	79.0 \pm 7.6	84.7 \pm 7.7	85.0 \pm 7.6	89.0 \pm 8.2

En otro grupo de experimentos, se inducían contracciones tras la administración de KCl (80 mM) y una vez alcanzada la contracción máxima se adicionaba de forma acumulativa diversas concentraciones de buscopán o alginor. Con este diseño se pretendía conocer si ambos fármacos eran capaces no sólo de inhibir el desarrollo de la actividad contráctil inducida por ambos agonistas, sino también de producir relajación en anillos de aorta previamente contraídos por éstos.

La figura 13 muestra que buscopán ($10^{-9}M - 5 \times 10^{-4}M$) producía una relajación de las contracciones inducidas por KCl (80 mM), pero no se encontraban diferencias en el grado de relajación producido a concentraciones comprendidas entre $10^{-8}M$ y $10^{-5}M$, siendo su $IC_{50} \geq 5 \times 10^{-4}M$ (su concentración aún persistía un $57.0 \pm 7.6\%$ de la respuesta contráctil).

Por el contrario, alginor ($10^{-15}M-10^{-9}M$) producía una relajación concentración-dependiente de las contracciones inducidas por KCl (80 mM), produciéndose una relajación total de estas contracciones a concentraciones $\geq 10^{-9}M$ (figura 14). Siendo el IC_{50} para relajar las contracciones inducidas por el KCl de $6.6 \pm 1.7 \times 10^{-4}M$.

1.4. CAPACIDAD DE BUSCOPÁN Y ALGINOR PARA RELAJAR LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA.

La figura 15, muestra que buscopán ($10^{-4}M - 5 \times 10^{-4}M$) producía una relajación dosis-dependiente de las contraccio-

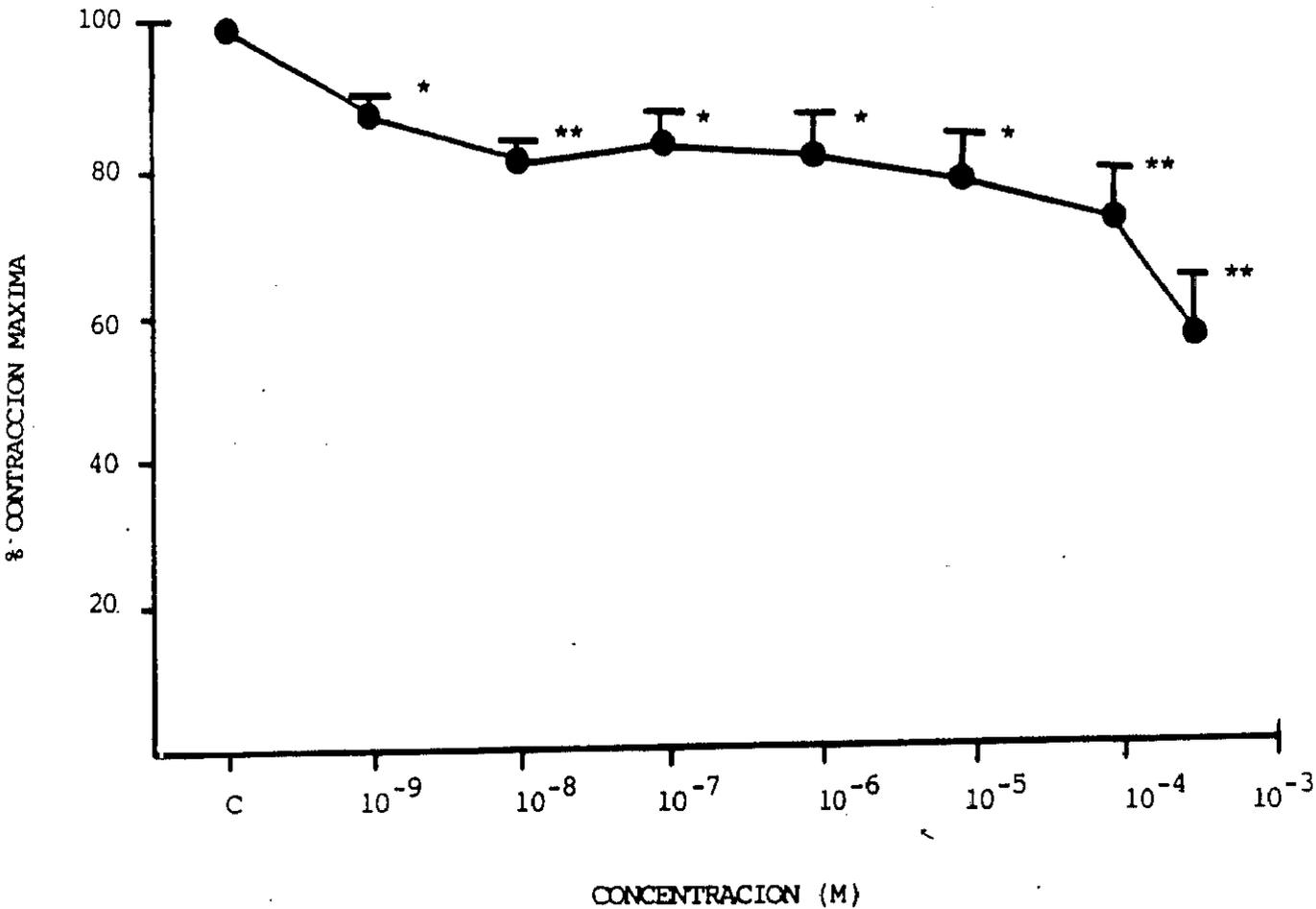


Figura 13.- Relajación inducida por BUS (10^{-6} M - 5×10^{-4} M) de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en aortas de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcissas: concentración molar de BUS. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 experimentos.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

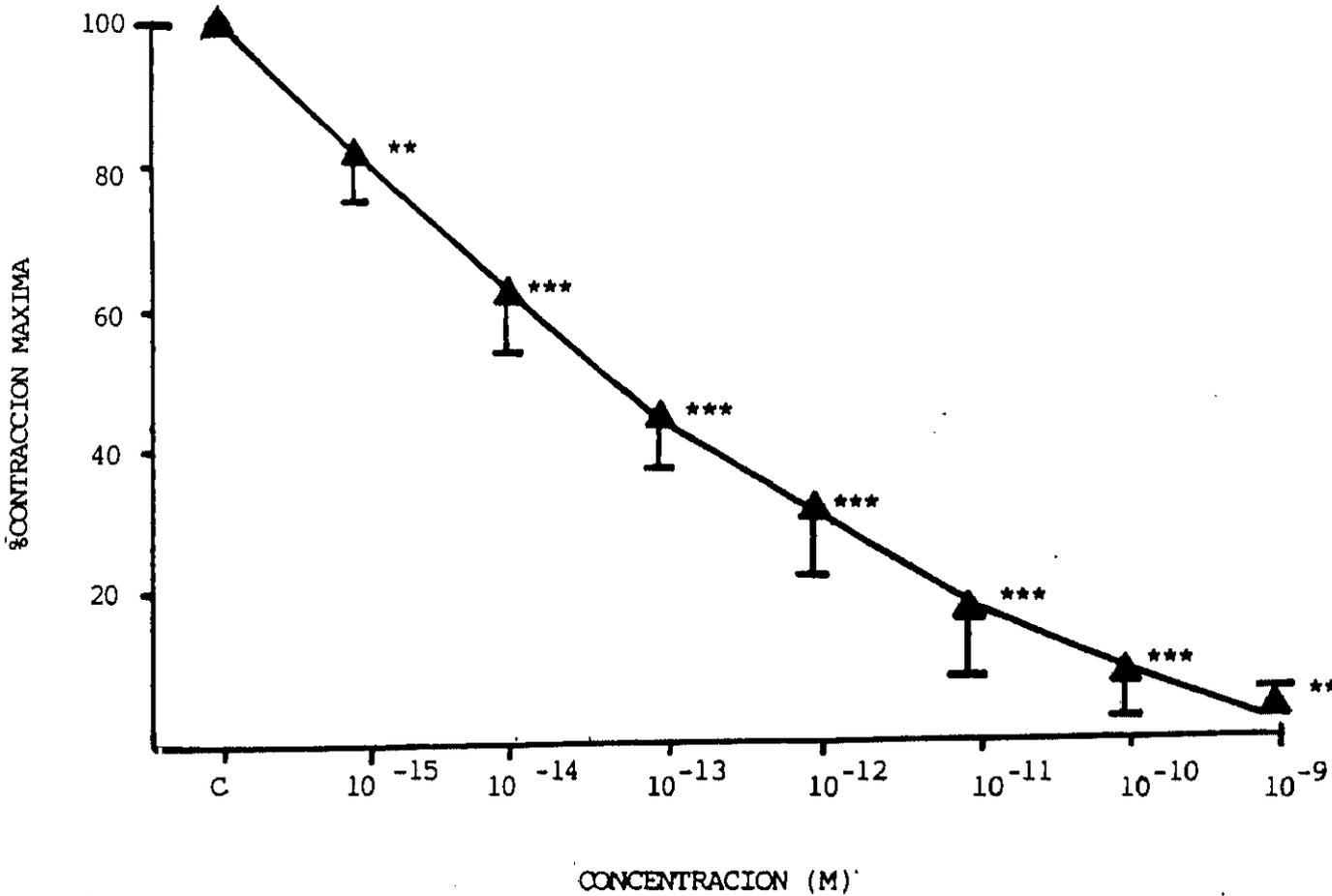


Figura 14.- Relajación inducida por ALG (10^{-15} M - 10^{-9} M) de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en aortas de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcissas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 experimentos.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

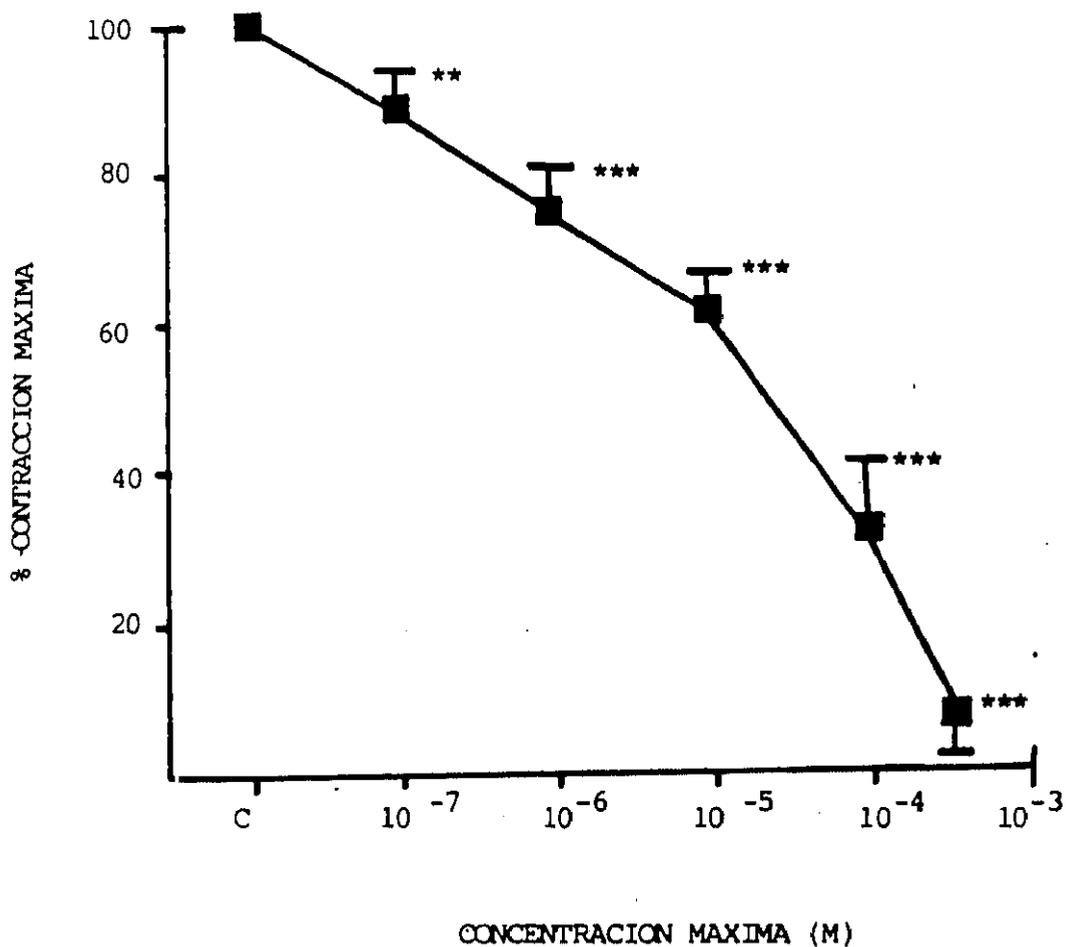


Figura 15.- Relajación inducida por BUS (10^{-6} M - 5×10^{-4} M) de las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en aortas de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcissas: concentración molar de BUS. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 experimentos.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

nes inducidas por NA, siendo su $IC_{50} = 4.0 \pm 3.0 \times 10^{-5}M$; puede verse además que a la concentración más alta ensayada buscopán produce casi una relajación completa de las respuestas contráctiles inducidas por NA. Comparando los datos de las figuras 13 y 15 es evidente que a concentraciones $>$ de $10^{-6}M$, buscopán producía una relajación significativamente menos marcada ($P < 0.05$) de las contracciones inducidas por KCl (figura 13) que de las inducidas por NA (figura 15).

EL alginor ($10^{-12}M-10^{-6}M$) producía una relajación concentración-dependiente de las contracciones inducidas por NA (figura 16), la relajación que producía alginor ($10^{-12}M-10^{-6}M$) era claramente inferior a la observada frente a KCl, observándose como incluso a la concentración de $10^{-6}M$ la respuesta contráctil alcanzaba un $41.5 \pm 8.5\%$ de la respuesta contráctil máxima inducida por este agonista. De hecho, el IC_{50} para relajar las contracciones inducidas por NA era de $2.2 \pm 1.2 \times 10^{-7}M$ ($p < 0.001$) frente a KCl era de $6.6 \pm 1.7 \times 10^{-14}M$ ($p < 0.01$) que era el obtenido cuando la contracción era inducida por KCl.

1.5. CAPACIDAD DE ALGINOR PARA RELAJAR LA CONTRACCIONES INDUCIDAS POR KCL Y NA.

En otro grupo de 6 experimentos los anillos de aorta se contraían inicialmente con 80 mM de KCl y una vez que la respuesta contráctil a este agonista alcanzaba valores

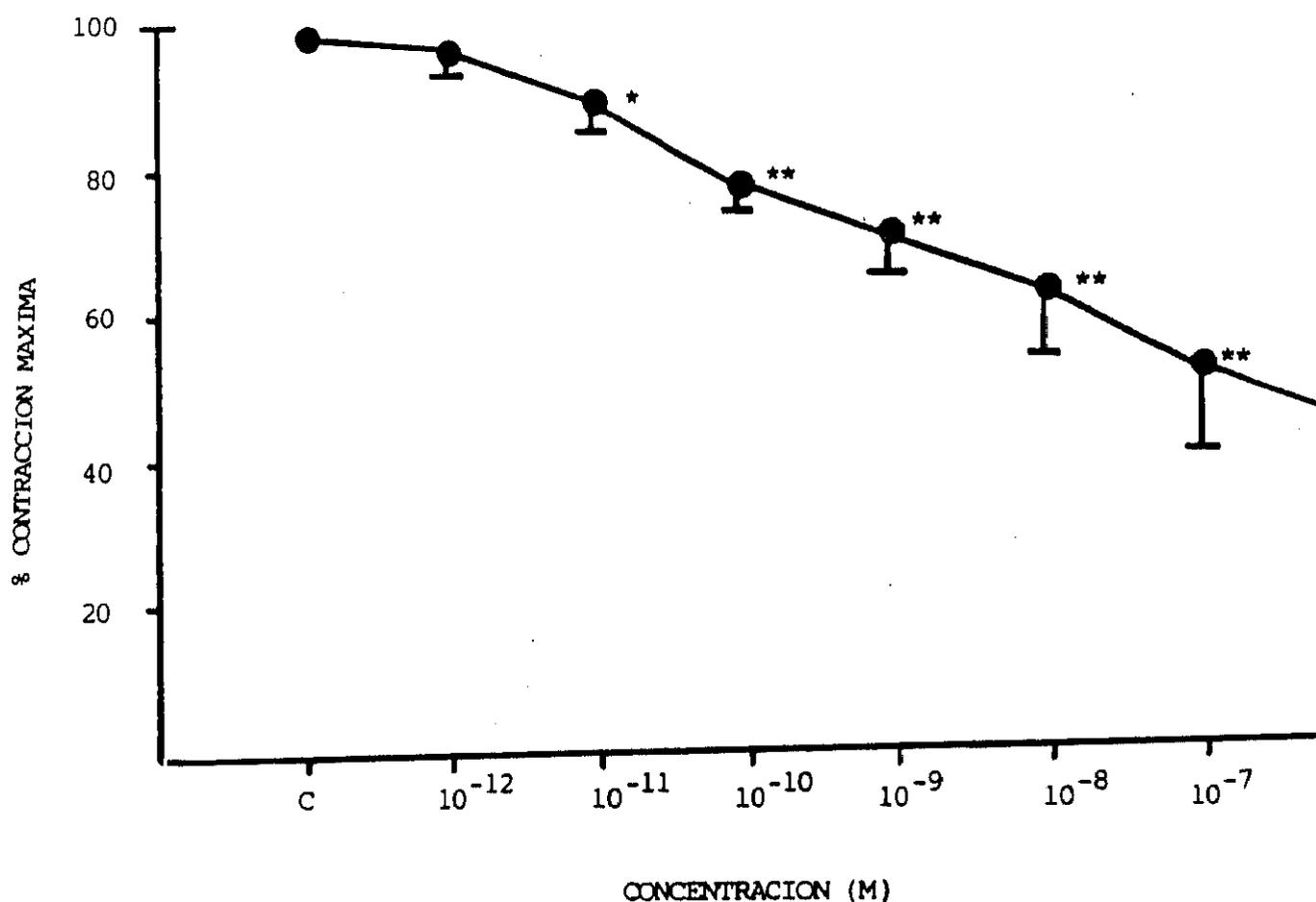


Figura 16.- Relajación inducida por ALG (10^{-12} M - 10^{-6} M) de las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en aortas de conejo. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcissas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 experimentos.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

estables se adicionaba al baño NA ($10^{-6}M$), de tal forma que se producía una respuesta contráctil superpuesta a la inicial del KCl. Cuando la respuesta inducida por NA alcanzaba valores estables se procedía a la administración de concentraciones acumulativas de alginor. A concentraciones comprendidas entre $10^{-14}M$ - $10^{-6}M$, el alginor producía una inhibición concentración-dependiente de la contracción inducida por ambos agonistas, observándose (figura 17) que a la concentración más alta ensayada esta respuesta era reducida en un $52 \pm 5.8\%$, valor muy similar al observado en la figura 16.

1.7. EFECTOS DE BUSCOPÁN Y ALGINOR SOBRE LA TENSIÓN BASAL.

En otro grupo de experimentos nos propusimos estudiar el efecto de buscopán ($10^{-7}M$ - $5 \times 10^{-4}M$) y alginor ($10^{-12}M$ - $10^{-5}M$) sobre la tensión basal. Las figuras 18 y 19 muestran respectivamente, que tanto buscopán como alginor producían una relajación concentración-dependiente de la tensión basal que alcanzaba valores significativos a todas las concentraciones ensayadas ($p < 0.05$). Así, a la máxima concentración ensayada, tanto buscopán ($5 \times 10^{-4}M$) como alginor ($10^{-5}M$) deprimen la tensión basal en un $32.5 \pm 8.9\%$ y $35.0 \pm 5.6\%$, respectivamente.

2. EXPERIMENTOS EN UN MEDIO EXENTO DE CALCIO.

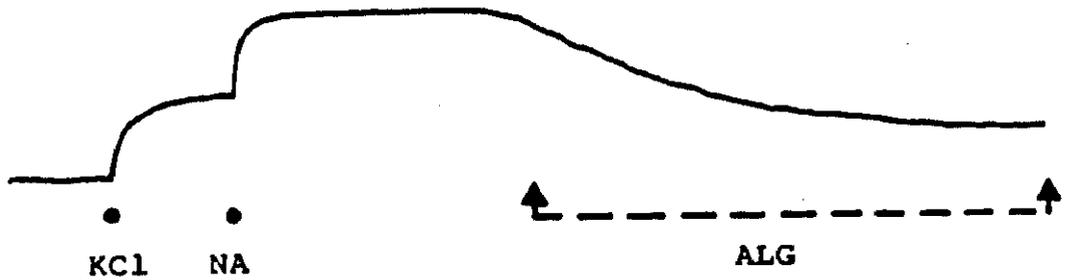


Figura 17.- Efectos del ALG sobre las contracciones inducidas por KCl (80 mM) y NA (10^{-6} M).

CONTROL	100
ALG, 10^{-14} M	100.7 ± 1.7
10^{-13} M	97.0 ± 1.2
10^{-12} M	90.5 ± 2.9
10^{-11} M	84.0 ± 4.4
10^{-10} M	77.5 ± 4.9
10^{-9} M	69.5 ± 5.4
10^{-8} M	59.0 ± 5.5
10^{-7} M	53.2 ± 5.9
10^{-6} M	48.0 ± 5.8

Media ± e.s.m. n = 6

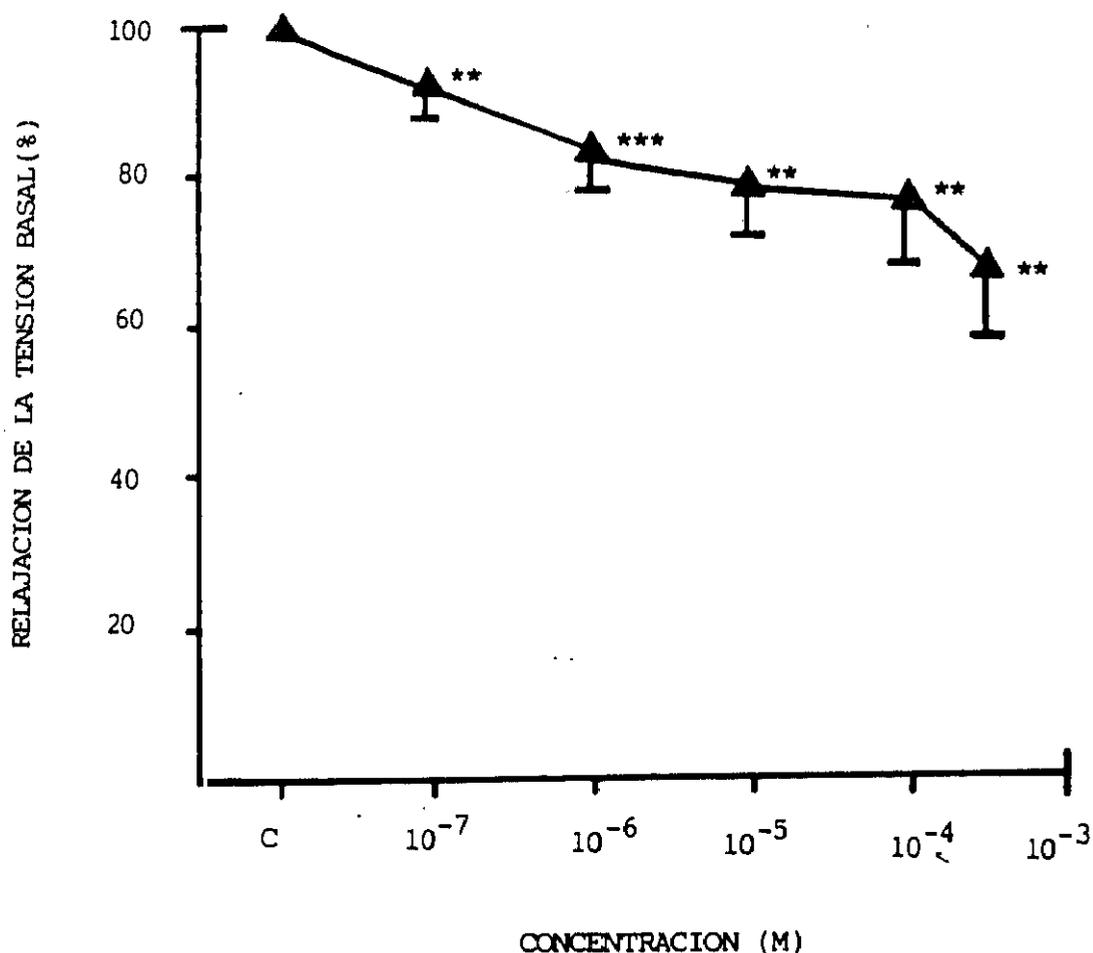


Figura 18.- Efecto de la BUS ($10^{-7}M$ - $5 \times 10^{-4}M$) sobre la tensión basal (2 g). Ordenadas: % de la relajación de la tensión basal. Abcisas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 10 experimentos.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

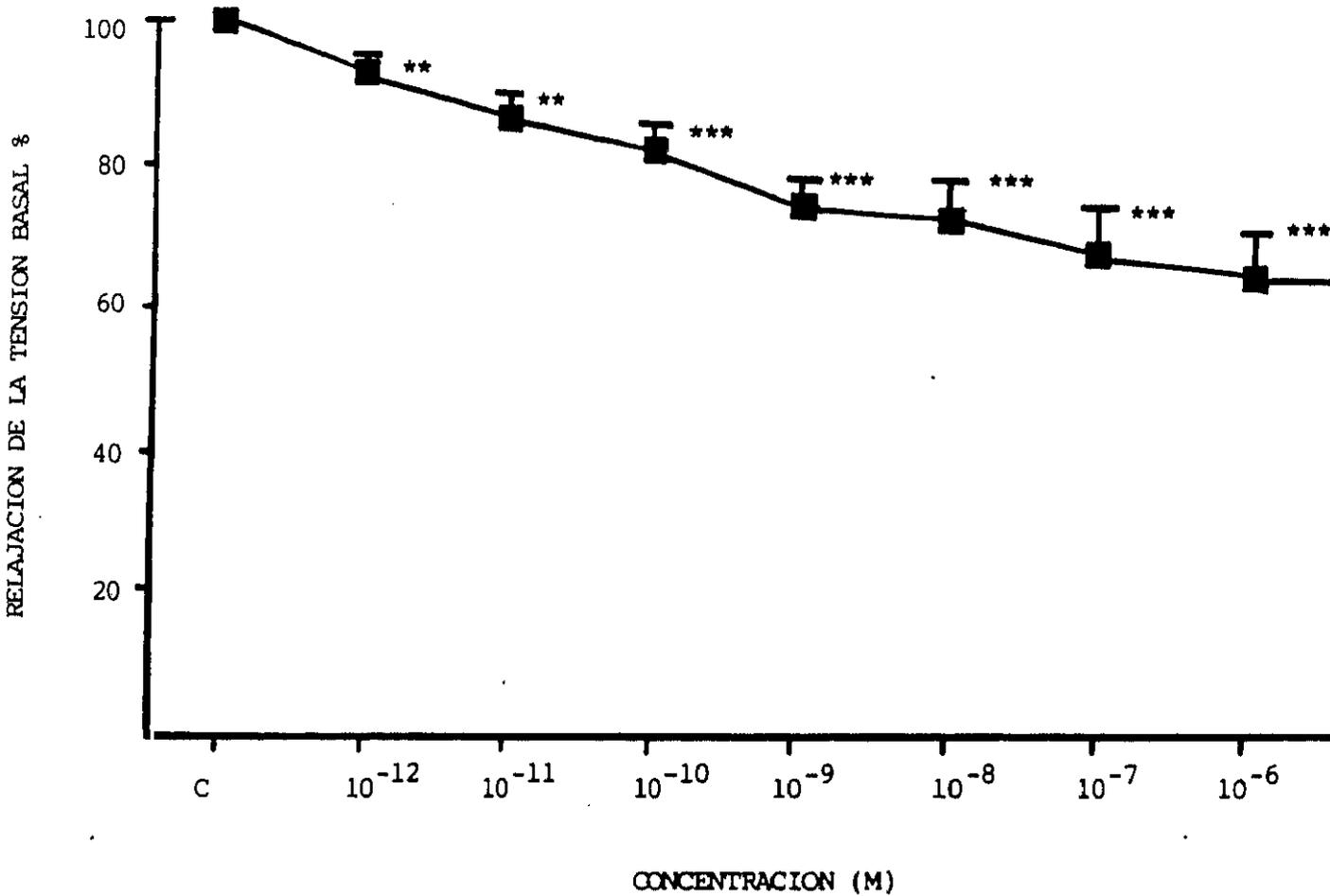


Figura 19.- Efecto del ALG (10^{-12} M - 10^{-6} M) sobre la tensión basal (2 g). Ordenadas: % de relajación de la tensión basal. Abcisas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 10 experimentos. *** $p < 0.001$.

2.1. EFECTOS DEL ALGINOR EN AORTA DESPOLARIZADA.

Los resultados observados con alginor nos hacían pensar que éste fármaco podría presentar propiedades antagonistas del Ca. El efecto más característico de los antagonistas del Ca es su capacidad para inhibir las contracciones inducidas al aumentar la $[Ca]_i$ en fibra muscular lisa vascular (FMLV) previamente despolarizadas por altas concentraciones de K^+ (GODFRAIND y cols, 1982). Por ello, en otro grupo de experimentos, anillos de aorta con endotelio fueron incubados durante 2 h en Krebs-0Ca. Al cabo de este tiempo la $[K]$ en el baño se incrementaba a 80 mM, lo que producía una pequeña respuesta contráctil. Una vez que ésta respuesta alcanzaba valores estables, se incrementaba en el baño la $[Ca]_i$ de forma progresiva, desde 1 a 5 mM, a lo largo de los siguientes 45 min. Ello originaba un incremento progresivo de la respuesta contráctil, es decir, que obteníamos una curva dosis-respuesta al Ca (figura 20).

El alginor, a la concentración de $10^{-10}M$, inhibía marcadamente ($p < 0.05$) las respuestas contráctiles inducidas por 1-5 mM de Ca, pero esta inhibición disminuía al incrementar la $[Ca]_i$ en el baño, de tal forma, que en presencia de 5 mM, la respuesta contráctil inducida por el Ca era de similar magnitud en presencia y en ausencia de alginor. Este resultado hace pensar que los efectos espasmolíticos del alginor podrían ser antagonizados al incrementar la $[Ca]_i$ en el baño.

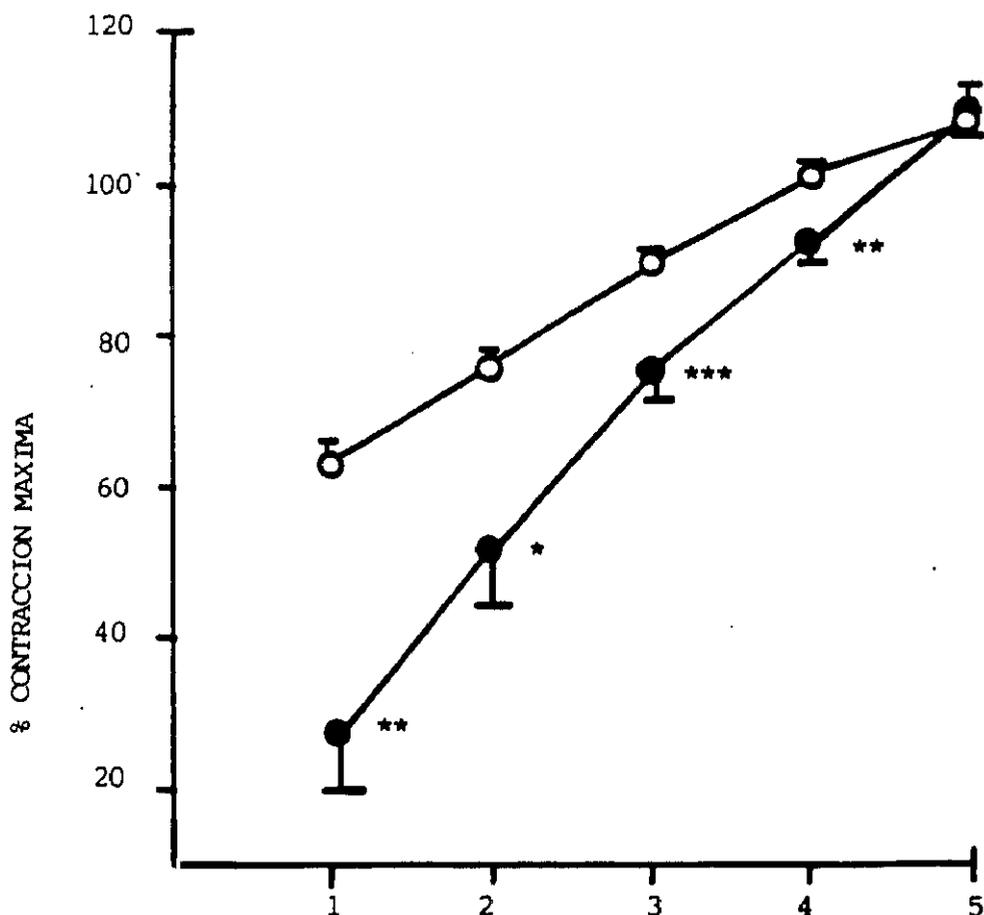


Figura 20.- Efecto del ALG (10^{-10}M) sobre las contracciones inducidas por Cl_2Ca (1 - 5 mM) en aorta de conejo incubadas en SK 0-Ca (-80 mM)K. En situación control se observa como en aortas despolarizadas la adición sucesiva de Ca al baño produce una respuesta contráctil. Esta curva dosis-respuesta al Ca era inhibida, en forma dosis-dependiente, excepto a la concentración más alta del Ca (5 mM), por nuestro fármaco. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: concentración de Cl_2Ca (mM). Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 10 experimentos.

(○) Control. (●) 10^{-10}M . * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2. ESTUDIO DE LOS POSIBLES EFECTOS INTRACELULARES DE BUSCOPÁN Y ALGINOR SOBRE LAS CONTRACCIONES PRODUCIDAS POR NA.

Los resultados descritos en la figura 10 indican que la buscopán inhibe el componente inicial fásico de las respuestas contráctiles inducidas por la NA. Dado que este componente parece ser debido a la movilización de Ca a partir de sus depósitos intracelulares, era lógico pensar que buscopán pudiera ejercer su acción vasodilatadora por interferir con la movilización del Ca intracelular inducida por NA. Para probar esta hipótesis realizamos el siguiente grupo de experimentos siguiendo el diseño experimental de HESTER y cols. (1986,1987).

En un primer grupo de experimentos que se muestran en la figura 21, tabla IX, los anillos intactos de aorta fueron contraídos por NA ($10^{-6}M$). A continuación se lavaba el agonista y las aortas se incubaban durante 15 min en solución de Krebs (SK) 0-Ca que contenía EGTA ($10^{-5}M$) y D600 ($10^{-5}M$). Con ello se pretendía que al reexponer la preparación al agonista se produjera una respuesta contráctil fásica exclusivamente, que no sería debida a la entrada de Ca, sino exclusivamente a la movilización de Ca desde los depósitos intracelulares. Si repetimos la administración de NA después de lavar repetidamente con SK 0-Ca + EGTA + D600, lógicamente

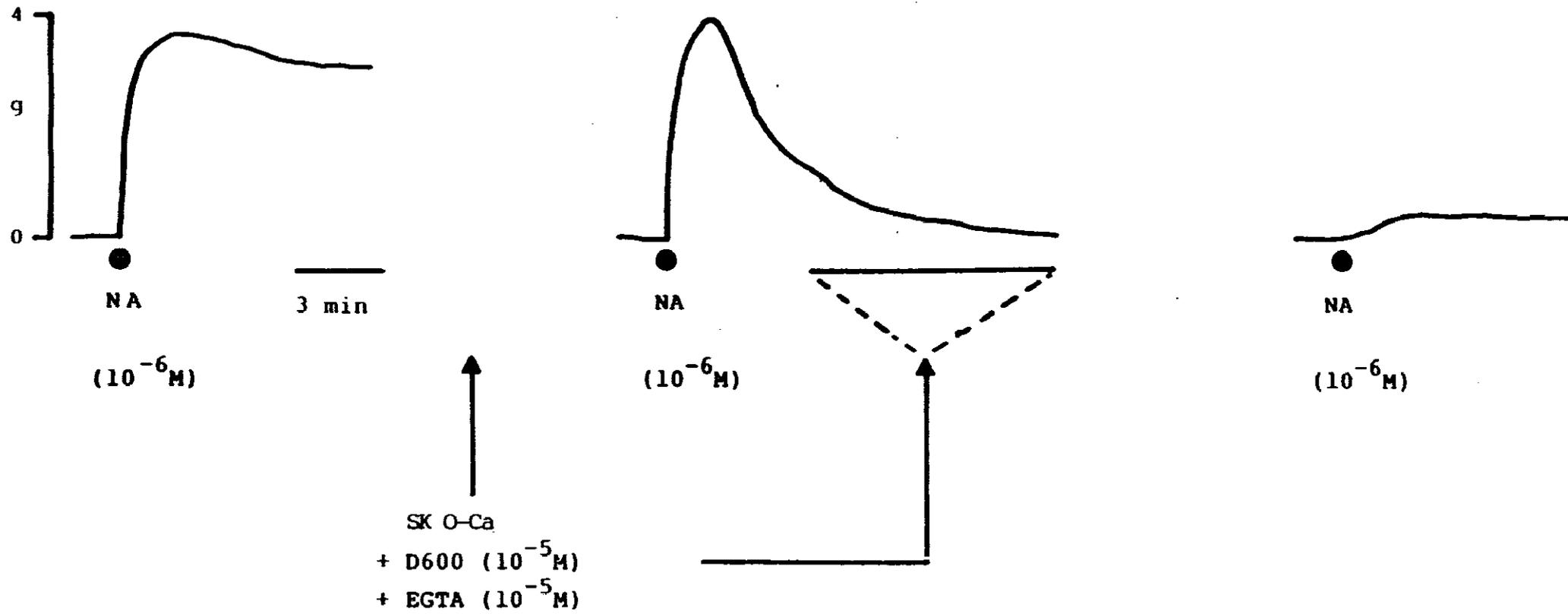


Figura 21 .- Ver explicación en el texto.

TABLA IX

	Control	10^{-4} M BUS	5×10^{-4} M BUS
NA	9.08 + 0.95	-	-
NA(O- Ca)	4.00 \pm 0.37	3.40 \pm 0.27	2.40 \pm 0.37
NA(O- Ca)	1.87 + 0.28	2.00 \pm 0.20	2.54 \pm 0.41

no obtendremos una respuesta contráctil. En la segunda parte del experimento, después de obtener la respuesta contráctil a la NA en SK, lavamos los anillos con SK 0-Ca + EGTA + D600 y añadimos la concentración deseada de buscopán ($10^{-4}M$) 20 min antes de añadir la NA, observando que en estas condiciones la respuesta contráctil inducida por éste agonista era inhibida en un $15 \pm 1.4 \%$ con respecto a la respuesta control (tabla IX). Sin embargo, en presencia de esta concentración de buscopán la segunda respuesta contráctil a la NA aumentaba en un $7 \pm 0.8\%$ con respecto a la control, dado que los depósitos intracelulares de Ca se habían movilizado menos en la primera respuesta. Estos resultados eran mucho más evidentes cuando la concentración de buscopán se incrementaba a $5 \times 10^{-4}M$. En estas condiciones la amplitud de la primera respuesta contráctil a NA era reducida en un $40 \pm 2.1 \%$ con respecto al control (tabla IX), lo que nos confirmaba que buscopán parece inhibir la movilización de Ca desde sus depósitos intracelulares. Dado que en estas condiciones el contenido de Ca de los depósitos intracelulares era mayor que en situación control, la respuesta contráctil inducida por la segunda administración de NA aumentaba hasta en un $35 \pm 1.8\%$ sobre aquella obtenida en ausencia del fármaco.

Estos experimentos indicaban que la buscopán era capaz de inhibir la movilización de Ca intracelular. Para confirmar estos resultados nos propusimos hacer el siguiente grupo de experimentos. Inducíamos una respuesta contráctil con NA

($10^{-6}M$) en SK y a continuación (siguiendo el diseño de la figura 22) se incubaban los anillos en SK 0-Ca + EGTA (0.01 mM) + D600 ($10^{-5}M$). En estas condiciones, al añadir NA al baño se producía una respuesta fásica que desaparecía rápidamente. Si en estas condiciones incrementábamos la $[Ca]_i$ a 2 mM, se producía un incremento de la fuerza contráctil que alcanzaba valores estables al cabo de 5 min, puesto que en el baño aún existe NA, esta respuesta contráctil reproduciría el componente tónico de este agonista (figura 22). Este mismo procedimiento experimental se reproducía en anillos pretratados 5 min antes de la adición de Ca al baño con la concentración deseada de buscopán ($5 \times 10^{-5}M$), observando que aparece una disminución de un $35 \pm 1.2\%$ respecto a la respuesta control en la respuesta contráctil inducida por la adición de 2 mM de Ca.

2.3. EFECTOS DEL ALGINOR SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR KCl EN AORTAS DESPROVISTAS DE ENDOTELIO.

En algunos experimentos se procedió a la eliminación del endotelio tras la introducción en la luz vascular de un vástago de madera según las técnicas descritas originalmente por FURCHGOTT y ZAWADKI (1980). La eliminación del endotelio vascular se confirmaba antes de iniciar cada experimento observando que la acetilcolina ($10^{-6}M$) no producía una relajación completa de las contracciones previamente induci-

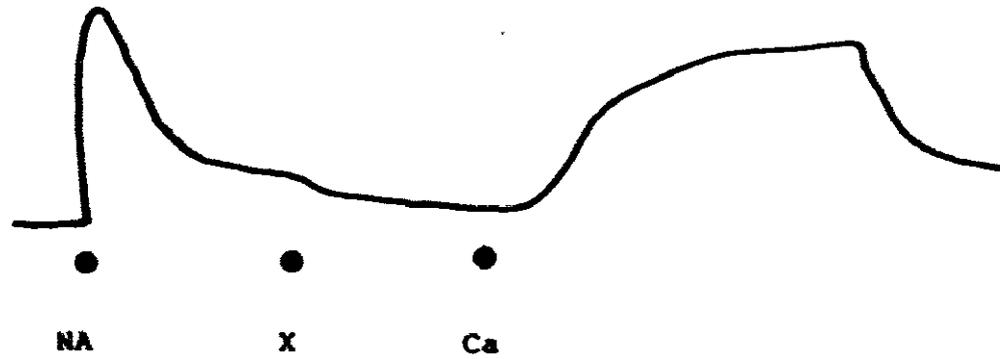
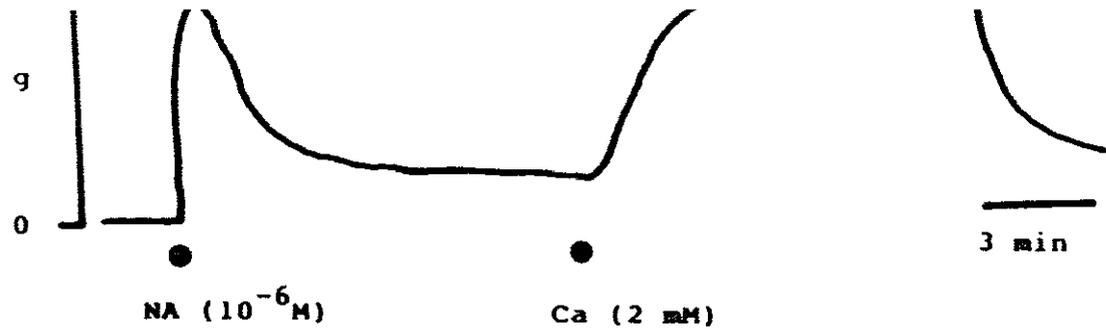


Figura 22.- Ver explicación en el texto.

das por NA (10^{-6} M), ya que la acetilcolina, en estas condiciones, no era capaz de relajar los anillos de aorta sin endotelio intacto.

La figura 23 muestra que, al contrario de lo observado en anillos con endotelio, alginor (10^{-14} M- 10^{-9} M) sólo producía una discreta inhibición de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta sin endotelio, que a la concentración más alta ensayada alcanzaba un $12.4 \pm 6.5\%$ con respecto al valor control. En la tabla X se muestran los efectos del alginor sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl en 16 experimentos realizados en anillos de aorta sin endotelio. Puede verse que en éste caso la acción depresora del fármaco es similar sobre los componentes fásico (30 seg) y tónico (15 min) de la respuesta contráctil inducida por KCl.

También hemos estudiado la capacidad de alginor (10^{-14} M- 10^{-6} M) para relajar las contracciones previamente inducidas por 80 mM KCl, observando (figura 24) que el fármaco producía una relajación concentración-dependiente que era menor que la descrita previamente en la figura 15 en anillos de aorta intacta, siendo el IC_{50} de $1.0 \pm 0.9 \times 10^{-8}$ M (figura 24). En la figura 25 que se comparan los efectos mostrados por alginor sobre la relajación de aortas con y sin endotelio. Estos resultados claramente indican que las acciones del alginor dependen de la presencia de un endotelio funcional.

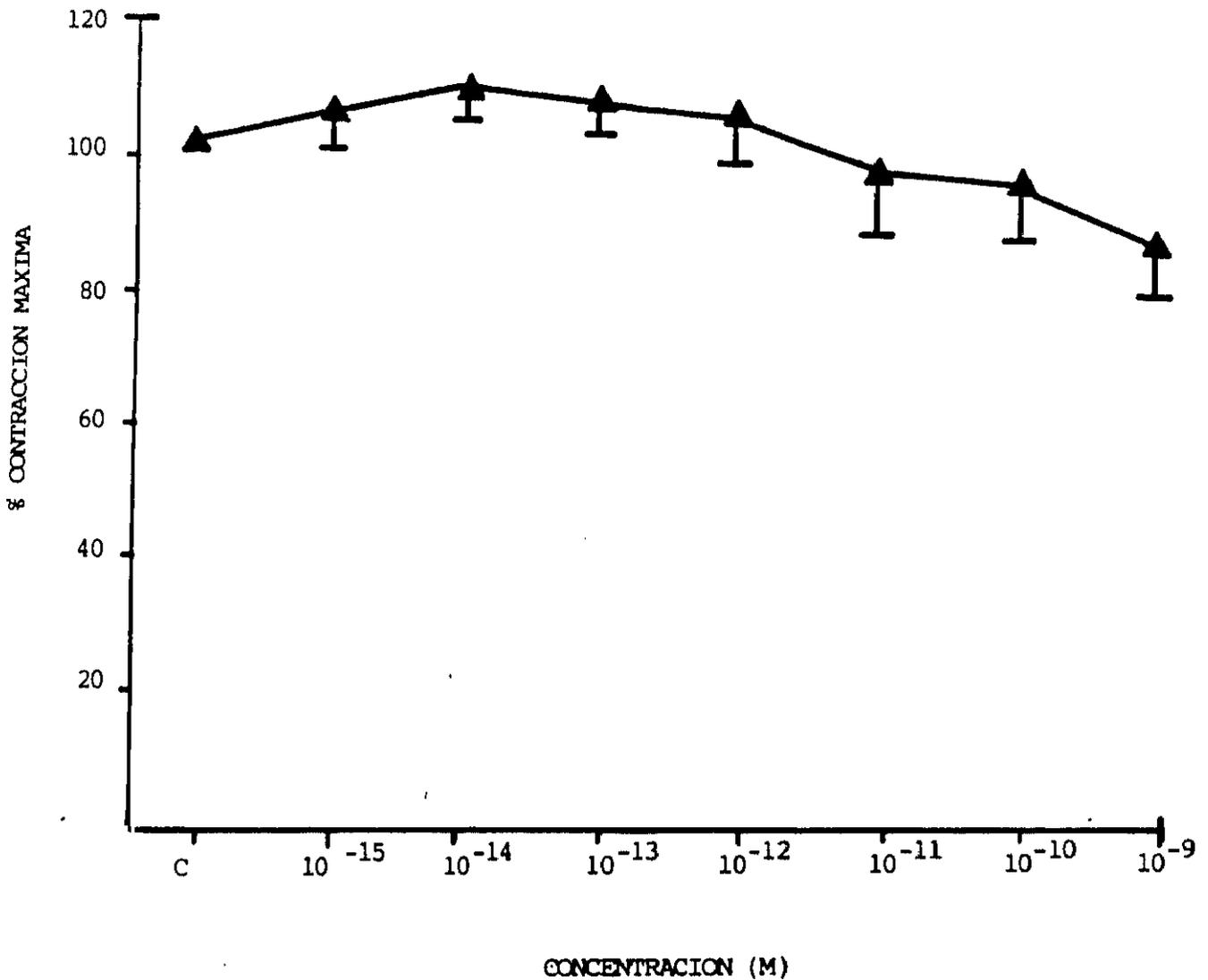


Figura 23.- Efectos de ALG (10^{-15} M - 10^{-9} M) sobre las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo sin endotelio. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 experimentos.

TABLA X .- Efecto del ALG sobre el desarrollo temporal de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en anillos de aorta de conejo sin endotelio. (n = 16, $\bar{x} \pm$ e.s.m.)

	0.5	1	2	3	4	5	10 Min
CONTROL	7.3 \pm 1.9	28.5 \pm 1.3	48.3 \pm 0.9	63.5 \pm 1.0	75.0 \pm 1.0	83.0 \pm 0.9	100
10 ⁻¹⁴ M	7.3 \pm 1.3	32.5 \pm 2.0	57.5 \pm 2.7	70.0 \pm 2.8	83.0 \pm 3.4	90.5 \pm 3.4	107.0 \pm 3.0
10 ⁻¹³ M	5.3 \pm 0.4	29.0 \pm 2.0	55.0 \pm 2.5	70.0 \pm 2.7	83.0 \pm 3.3	93.0 \pm 4.1	107.0 \pm 4.0
10 ⁻¹² M	4.5 \pm 0.7	29.0 \pm 2.4	56.0 \pm 3.3	67.0 \pm 3.5	82.0 \pm 4.7	91.0 \pm 5.7	108.0 \pm 6.0
10 ⁻¹¹ M	4.0 \pm 0.8	26.0 \pm 2.9	47.0 \pm 3.9	61.0 \pm 3.6	74.5 \pm 5.0	83.0 \pm 5.3	101.0 \pm 6.0
10 ⁻¹⁰ M	3.5 \pm 1.0	20.0 \pm 3.5	40.0 \pm 5.0	59.0 \pm 7.0	67.0 \pm 6.0	76.0 \pm 6.4	97.0 \pm 8.0
10 ⁻⁹ M	3.4 \pm 0.8	17.4 \pm 3.0	34.0 \pm 3.8	48.0 \pm 4.8	59.0 \pm 5.4	68.0 \pm 6.0	90.0 \pm 7.0

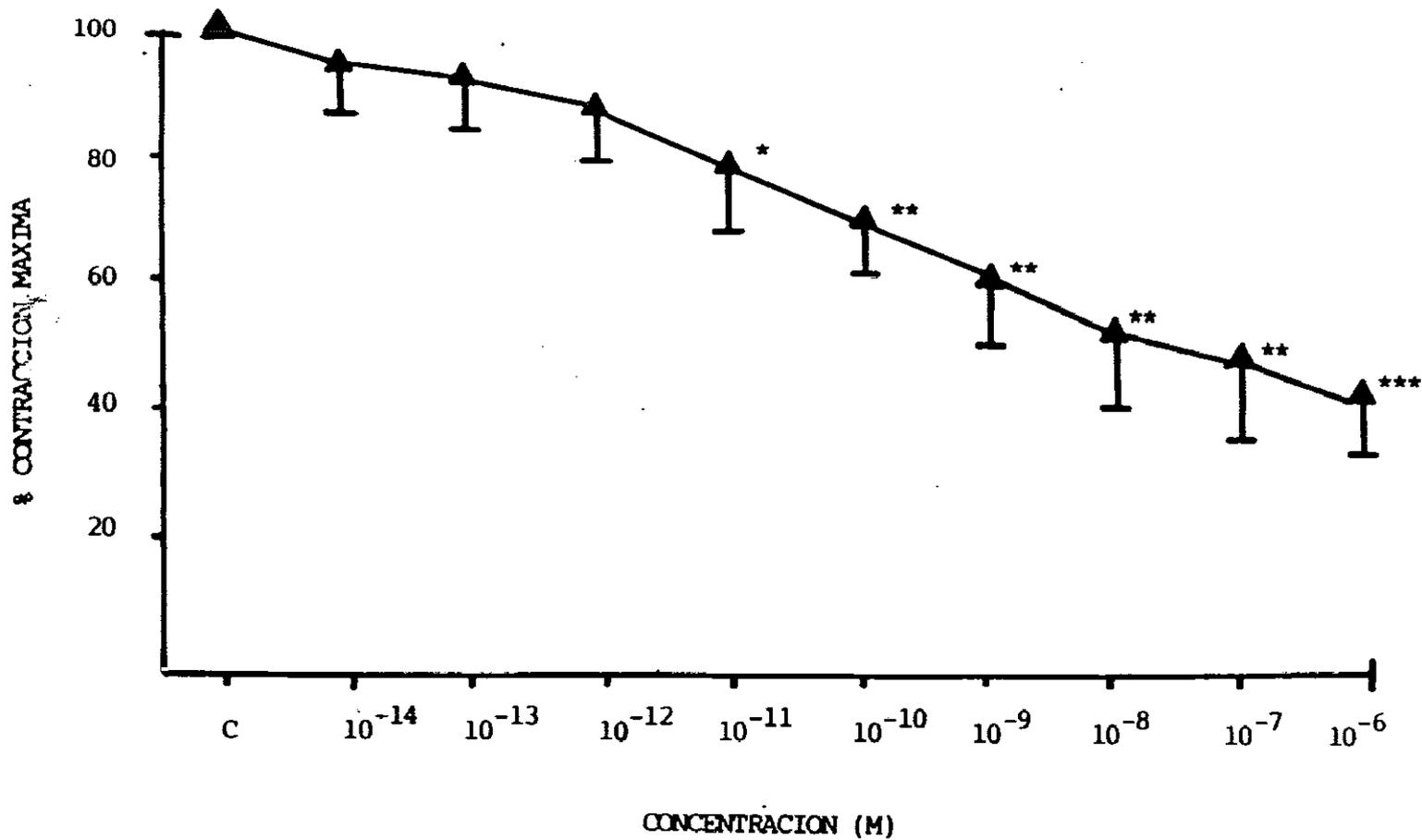


Figura 24.- Relajación inducida por ALG ($10^{-14}M - 10^{-6}M$) de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en aortas de conejo sin endotelio. Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 30 experimentos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

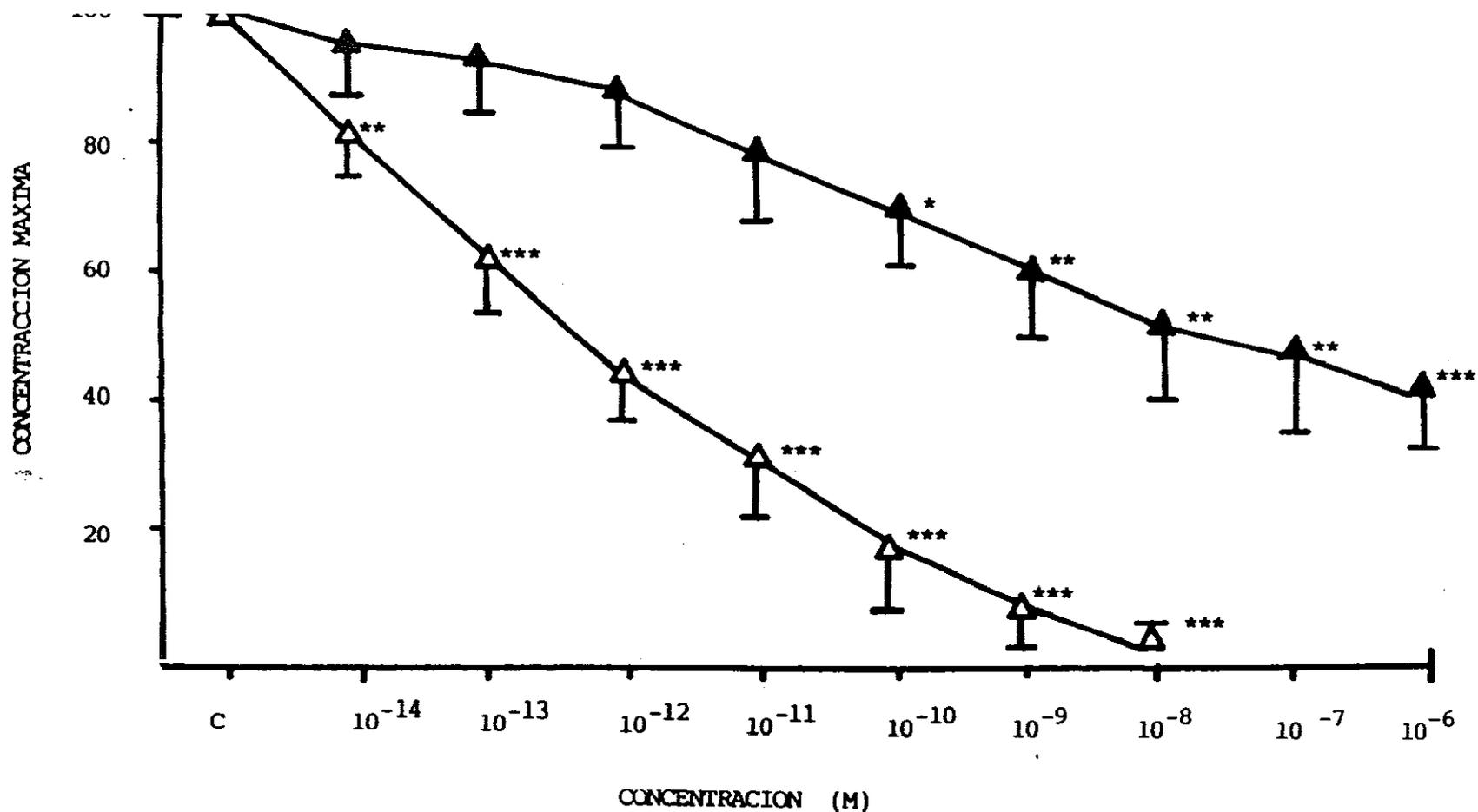


Figura 25.- Relajación inducida por ALG ($10^{-14}\text{M} - 10^{-6}\text{M}$) de las contracciones inducidas por KCl (80 mM) en aortas de conejo con endotelio (▲) y sin endotelio (△). Ordenadas: % de la contracción máxima. Abcisas: concentración molar de ALG. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 15 y 30 experimentos, respectivamente.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. DETERMINACION DE LOS FLUJOS DE CALCIO.

Podemos distinguir tres tipos de experimentos en los que se estudia la acción de Buscopan y Alginor sobre la entrada de Ca: 1) estimulada por NA, 2) estimulada por KCl y 3) en condiciones basales.

3.1. ACCIÓN DE BUSCOPÁN SOBRE LA ENTRADA DE ^{45}Ca .

3.1.1. Estimuladas por KCl.

Los efectos de buscopán (10^{-4}M - $5 \times 10^{-4}\text{M}$) sobre los flujos de ^{45}Ca se muestran en la figura 26. En aortas estimuladas por KCl (80 mM) los valores de captación eran de $263 \pm 7.8 \mu\text{mol Ca/Kg}$ de tejido húmedo en presencia de buscopán 10^{-4}M , siendo para buscopán $5 \times 10^{-4}\text{M}$ de $229 \pm 9 \mu\text{mol Ca/kg}$ de tejido húmedo ($p < 0.05$).

3.1.2. Estimuladas por NA.

Cuando estimulábamos la captación de ^{45}Ca con NA (10^{-6}M), buscopán 10^{-4}M no producía cambios en la captación de ^{45}Ca , pero a la concentración más alta ensayada, $5 \times 10^{-4}\text{M}$, producía una reducción significativa en la captación de ^{45}Ca , reduciéndose estos valores desde $275 \pm 16 \mu\text{mol Ca/kg}$ de tejido húmedo, hasta $232 \pm 14 \mu\text{mol Ca/kg}$ de tejido húmedo ($p < 0.05$) (figura 26).

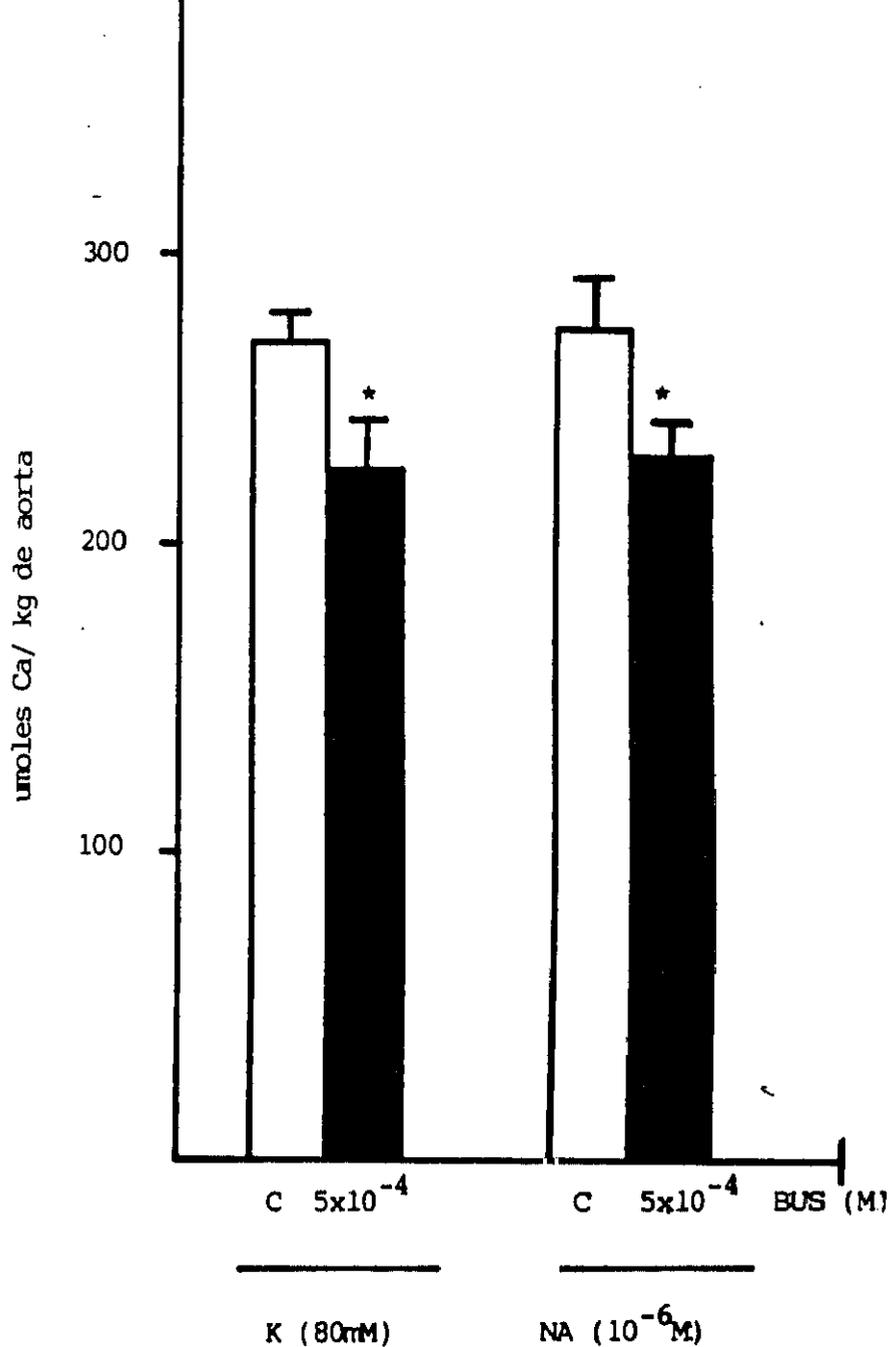


Figura 26.- Efecto de la BUS sobre el flujo de entrada de ⁴⁵Ca determinado en anillos de aorta estimulados con KCl (80 mM) o NA (10⁻⁶M). Las barras blancas indican los resultados obtenidos en ausencia y las negras en presencia de fármaco. Ordenadas: μmoles de Ca/kg de aorta. Cada determinación representa la media ± e.s.m. de 16 experimentos. *p<0.05.

3.2. ACCIÓN DE ALGINOR SOBRE LA ENTRADA DE ^{45}Ca .

3.2.1. En condiciones basales.

En este primer grupo de experimentos (figura 27), estudiamos el efecto de alginor sobre la captación de ^{45}Ca en condiciones basales (B), es decir, aortas no estimuladas, observando que no se modificaba a ninguna de las concentraciones ensayadas (10^{-11}M y 10^{-10}M). Así, en presencia de 10^{-10}M , alginor disminuía la captación basal de 154.0 ± 18.2 a $151.3 \pm 15.3 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo ($p > 0.05$).

3.2.2. Estimuladas por KCl.

En anillos estimulados por KCl la captación de ^{45}Ca aumentaba hasta $371.3 \pm 21.0 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo. En presencia de alginor 10^{-11}M , la captación era reducida a $315.6 \pm 20.2 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo ($p < 0.05$). En presencia de 10^{-10}M , el alginor reducía la captación desde $383.4 \pm 20.1 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo hasta $342.4 \pm 20.5 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo ($p < 0.05$) (figura 27).

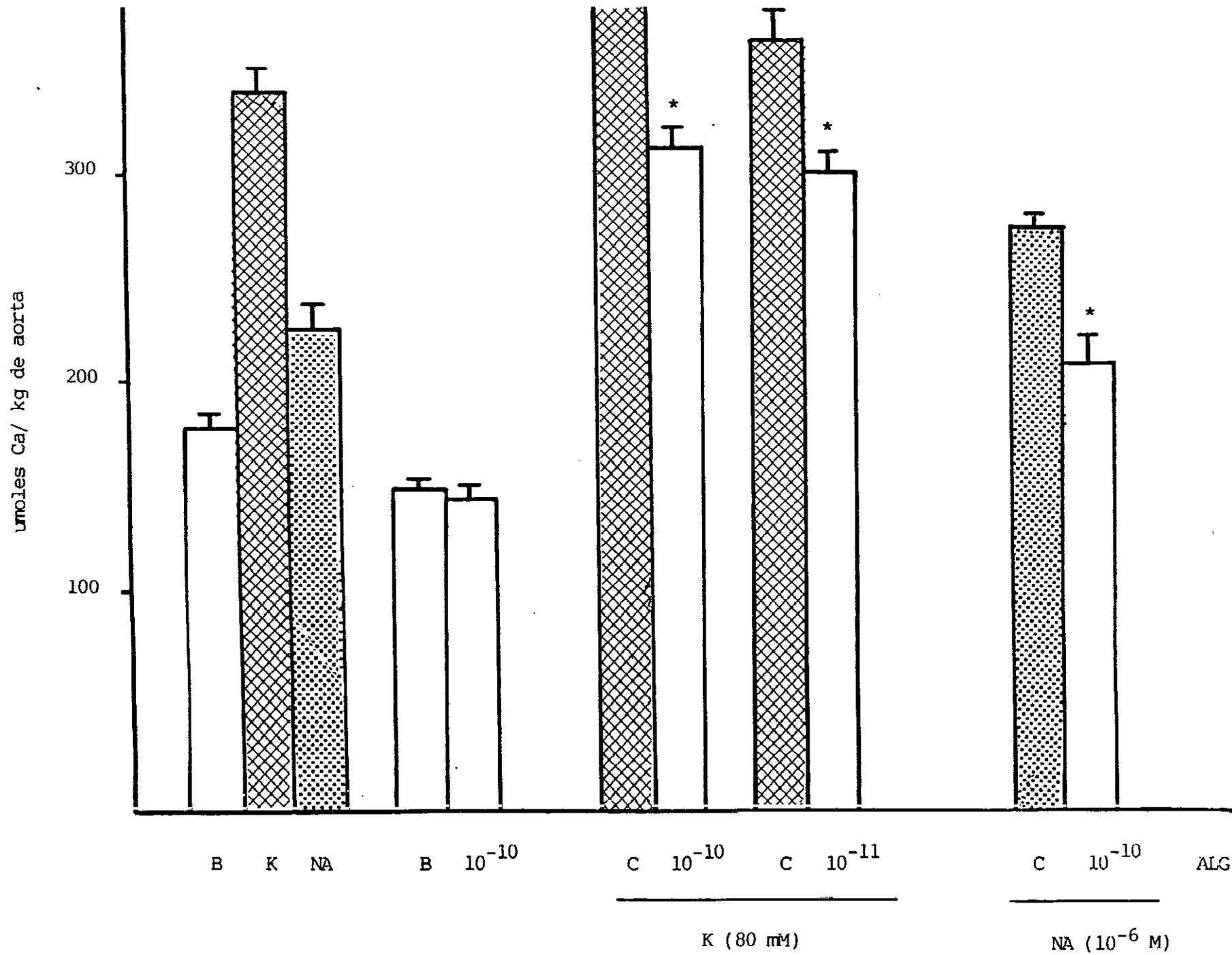


Figura 27.- Efecto del alginor sobre el flujo de entrada de ^{45}Ca determinado en condiciones basales (B) y tras estimulación con KCl (80 mM) o NA (10^{-6}M). Las barras blancas indican los resultados obtenidos en ausencia y las negras en presencia de fármaco. Ordenadas: $\mu\text{moles de Ca/kg de aorta}$. Cada determinación representa la media \pm e.s.m. de 20 experimentos.

* $p < 0.05$

3.2.3. Estimuladas por NA.

Finalmente, estudiamos los efectos de alginor sobre la captación de ^{45}Ca a través de los canales receptor-dependientes, determinando sus efectos en anillos de aorta en los que la captación había sido estimulada con NA (10^{-6}M), observando que alginor sólo a la concentración más alta utilizada, 10^{-10}M , producía una inhibición significativa ($p < 0.05$) de la captación de ^{45}Ca (275.5 ± 16.1 versus $217.3 \pm 25.1 \mu\text{mol Ca/kg}$ de peso de tejido húmedo), tal y como se muestra en la figura 27.

DISCUSSION.

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado de forma equimolecular los efectos de dos fármacos espasmolíticos, el buscopán y el alginor, en anillos de arteria de aorta de conejo, con y sin endotelio, a fin de conocer y comparar su potencia vasodilatadora y su posible mecanismo de acción.

Las contracciones inducidas por altas concentraciones de KCl han sido atribuidas a un aumento del flujo de entrada de Ca extracelular $[Ca]_o$ a través de los canales tipo-L de la membrana, ya que se suprimen en un medio 0Ca (SOMLYO y SOMLYO, 1968; HUDGINS Y WEISS, 1968; GODFRAIND y KABA, 1969; BOLTON, 1979) y tras la administración de antagonistas del Ca (GODFRAIND y cols, 1986). En nuestros experimentos, tanto el buscopán, como el alginor, producían una inhibición concentración-dependiente de estas contracciones. Sin embargo, mientras que a concentraciones inferiores a $10^{-6}M$ la inhibición producida por el buscopán era mínima y a la máxima concentración ensayada persistía casi un 60%, de la respuesta contráctil, con el alginor el efecto inhibitor era ya patente a concentraciones de $10^{-13}M$, alcanzándose un IC_{50} de $2.5 \pm 3.0 \times 10^{-11}M$. No obstante, al aumentar en cuatro unidades logarítmicas la concentración de alginor podía observarse como casi un 40% de la respuesta contráctil inducida por el KCl no podía ser bloqueada. Este efecto era independiente del momento en que se administraba el agonista, antes o después de inducir la contracción, lo que confirma la potente acción

espasmolítica del alginor en anillos de aorta de conejo. Ello sugería que ambos fármacos, podían ejercer su acción espasmolítica como consecuencia de su capacidad para inhibir el flujo de entrada de Ca, pero que esta inhibición era 5 órdenes de magnitud más marcada para el alginor, cuyo IC_{50} es superior al de muchos antagonistas del Ca actualmente en uso clínico.

Con el fin de conocer si el alginor, que era el fármaco más efectivo para inhibir las contracciones inducidas por el KCl, era capaz de inhibir la entrada de Ca a través de canales voltaje-dependientes tipo-L (VOCs) estudiamos sus efectos sobre las contracciones inducidas al incrementar la $[Ca]_o$ en arterias previamente despolarizadas por 80 mM de K. En estas condiciones los canales se encuentran activados y al aumentar la concentración de Ca, éste entra con facilidad a favor de gradiente electroquímico. Como se muestra en la figura 20, el alginor producía una marcada inhibición de las respuestas contráctiles inducidas por concentraciones "fisiológicas" de Ca (1-2 mM); sin embargo, puede observarse como al incrementar por encima de 3 mM la $[Ca]_o$ era posible revertir el efecto del alginor. Estos resultados indicaban que el alginor, incluso a muy bajas concentraciones ($10^{-10}M$), era capaz de inhibir el flujo de entrada de Ca a través de VOCs en las fibras musculares lisas vasculares y que este efecto, al igual que sucedía con los antagonistas del Ca (FLECKENSTEIN, 1983; GODFRAIND y cols. 1986), podía revertirse al incrementar la $[Ca]_o$.

Con el fin de comprobar esta hipótesis determinamos los efectos del alginor sobre la captación de ^{45}Ca en aortas estimuladas con KCl. En nuestras condiciones experimentales el alginor, ya a concentraciones comprendidas entre 10^{-11}M y 10^{-10}M inhibía dicha captación. Dado que el KCl despolariza el potencial de membrana vascular desde -45 ó -50 mV hasta -35 mV, facilitaría la activación-apertura de los canales de Ca voltaje-dependientes tipo-L (VOCs) y la entrada de Ca a su través (BEAN, 1989; TAMARGO, 1992). Por tanto, la contracción y el flujo de entrada de ^{45}Ca inducidos al incrementar la concentración de K en el medio podrían considerarse como una medida indirecta de la entrada de Ca a través de VOCs (CAUVIN y cols. 1983). Los resultados observados en presencia de alginor sobre la captación de ^{45}Ca estimulada por KCl indican que la inhibición que este fármaco produce sobre las contracciones inducidas por el KCl es debido a su capacidad para bloquear el flujo de entrada de Ca a través de VOCs. Desde este punto de vista, el alginor se comportaría como un antagonista de Ca de tipo inespecífico según la clasificación de VANHOUTTE (1987). Más aún su potencia inhibitoria a este respecto es muy marcada (si se compara con la de algunos de los antagonistas del Ca específicos actualmente comercializados), lo que podría explicar porqué una parte de la respuesta contráctil inducida por el KCl no es bloqueada por ninguno de ellos.

Los hallazgos obtenidos con el buscopán indican que este fármaco es mucho menos activo para bloquear los VOCs y la

captación de ^{45}Ca , por lo que su potencia antagonista del Ca es mucho menos marcada (al menos 6 órdenes de potencia) que la del alginor. De hecho, sólo en presencia de muy altas concentraciones de buscopan ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) fue posible demostrar una inhibición significativa de la captación de ^{45}Ca , y aún en estas condiciones el fármaco no es capaz de inhibir más que un 60% de las respuestas inducidas por el KCl en nuestras condiciones experimentales. Ello confirma su pobre actividad antagonista del Ca.

Las respuestas contráctiles inducidas por la NA pueden ser disociadas en dos componentes: a) un componente inicial rápido (fásico), que persiste en SN-0Ca (figura 11) y que no es suprimido por antagonistas del Ca, por lo que ha sido atribuido a la movilización del Ca almacenado desde sus depósitos intracelulares (HUDGINS y WEISS, 1968; GODFRAIND y KABA, 1969). Este componente va seguido de b) otro componente tardío (tónico), que se suprime en SN-0Ca (figura 11) y tras la administración de antagonistas del Ca (GODFRAIND y KABA, 1969; STEINSLAND y cols, 1973), por lo que ha sido atribuido a la entrada de Ca extracelular a través de canales receptor-dependientes (ROCs). El buscopán produce una inhibición dosis-dependiente de ambos componentes (figuras 10 y 11), si bien era más marcada la depresión del componente fásico que la producida sobre el tónico; resultados similares fueron obtenidos en presencia de alginor, si bien este

fármaco era menos potente para deprimir las contracciones inducidas por la NA que el buscopán. Estos datos sugerían que ambos fármacos podrían inhibir las respuestas contráctiles inducidas por la NA, tanto por interferir con la movilización del $[Ca]_i$, como por inhibir el flujo de entrada de Ca a través de los ROCs, si bien su acción intracelular parecía ser la más importante. Este hallazgo, de nuevo confirma la pobre potencia que el buscopán tenía para inhibir el flujo de entrada de Ca, en este caso a través de ROCs.

Esta afirmación parece avalada por otros dos grupos de experimentos. 1) En aortas incubadas en $SN-0Ca + EGTA + D600$ la adición de NA al baño producía sólo una respuesta fásica, que era debida exclusivamente a la movilización de Ca desde sus depósitos intracelulares (figura 21), ya que no existe Ca en el medio extracelular y además, se ha bloqueado su entrada a través de cualquiera de los canales por la adición de EGTA y D600 al medio. Si a continuación se restauran los valores de Ca en el medio, se obtenía una respuesta contráctil mantenida, cuya amplitud era similar a la de la respuesta fásica previa. Esta respuesta contráctil tónica no puede atribuirse a la liberación de $[Ca]_i$, que ya había sido liberado tras la adición previa de NA, ni a la entrada de Ca a través de VOCs (que están bloqueados por el D600); por tanto, estas respuestas contráctiles representarían, en parte al menos, una medida indirecta del flujo de entrada de Ca a través de ROCs. En nuestros experimentos, el buscopán inhibía

en un 35% esta respuesta contráctil inducida por el Ca en presencia de NA, lo que confirmaba la hipótesis de que el fármaco inhibía la entrada de Ca a través de ROCs. 2) Ambos fármacos, buscopán y alginor, producían una inhibición del flujo de entrada de ^{45}Ca en anillos estimulados por NA; puesto que este diseño permite la medida del flujo de entrada de Ca a través de los ROCs (CAUVIN y cols 1983), nuestros resultados indican que ambos fármacos inhiben este flujo de entrada a través de los ROCs. Sin embargo, de nuevo pudimos observar que la concentración de alginor a la que se inhibía el flujo de entrada era 6 órdenes de magnitud mayor para el buscopán que para el alginor. Estos hallazgos de nuevo confirman que el alginor es mucho más efectivo que el buscopán para inhibir la conductancia de la membrana a través de los ROCs.

Pero nuestros datos experimentales indicaban que la acción vasodilatadora inducida por ambos fármacos podría estar también relacionada con una acción intracelular. De hecho, ya hemos indicado que a favor de ello estaría el hallazgo de que inhiben el componente fásico de las contracciones inducidas por la NA. Con el fin de caracterizar un posible efecto de el buscopán sobre la liberación de $[\text{Ca}]_i$ inducida por la NA, incubamos las aortas en $\text{SN-0Ca} + \text{EGTA} + \text{D600}$. En estas condiciones la NA produce exclusivamente una respuesta fásica, lo que unido a la observación de que en estas condiciones no era posible obtener una segunda respues

ta a la NA, sugería que esta respuesta fásica era debida a la liberación de Ca desde un depósito intracelular sensible a la NA que se vaciaba tras la primera administración de este agonista (VAN BREEMEN y cols., 1972; HESTER y cols, 1986). A favor de esta hipótesis estaba el hallazgo de que a menos que se lavase la NA y se reincubase la aorta en un medio con Ca no era posible obtener una nueva respuesta fásica. En otras palabras, en ausencia de Ca y/o en presencia de NA, no podía rellenarse este depósito sensible a NA (KARAKI y WEIS, 1979; HESTER y cols, 1987). En nuestros experimentos, el buscopán y la NA se lavaban con SN-0Ca + EGTA + D600 antes de reexponer las preparaciones a NA, observando que mientras que en aortas control no aparecía una segunda respuesta a la NA (figura 21) en las aortas expuestas a buscopan, en las que la respuesta inicial a la NA estaba claramente inhibida, era posible obtener una segunda respuesta a la NA, cuya amplitud era inferior a la respuesta fásica inicial (tabla 9). Estos resultados indicaban que en presencia de buscopán, la NA era capaz de liberar una cantidad mucho menor de $[Ca]_i$ desde los depósitos sensibles a este agonista, lo que explicaba el 40% de reducción en la amplitud de la respuesta fásica. Como consecuencia de que el buscopán inhibía la liberación de $[Ca]_i$, en presencia del fármaco quedaría más Ca almacenado en sus depósitos intracelulares y, por tanto, una segunda administración de NA sería capaz, a diferencia de lo que sucede en situación control, de generar una respuesta fásica.

Estos resultados sugieren que en presencia de buscopan disminuye la liberación de $[Ca]_i$ inducida por la NA y que una vez que el fármaco ha sido eliminado del medio de incubación, es posible inducir la liberación del Ca aún almacenado por una nueva administración de NA.

Como resultado de su capacidad para inhibir, no sólo el flujo de entrada de Ca a través de los VOCs y ROCs, sino también para inhibir la movilización del $[Ca]_i$ almacenado, ambos fármacos producirían una disminución de la $[Ca]_i$, disponible a nivel de las proteínas contractiles que explicaría su capacidad para relajar anillos de aorta previamente contraídos por KCl y/o NA. Los resultados presentados en la figura 14 muestran la gran potencia del alginor para relajar las contracciones producidas por el KCl, confirmando su gran potencia antagonista del Ca. De hecho, el IC_{50} para inhibir las contracciones inducidas por el KCl era 7 órdenes de magnitud menor que el necesario para inhibir las contracciones inducidas por la NA.

Por otro lado, el alginor inhibe las contracciones inducidas tras la administración conjunta de KCl y NA. Este hallazgo, unido a su potente acción inhibidora de la contracción inducida por 80 mM KCl indica que las acciones vasodilatadoras de este fármaco no pueden atribuirse a sus propiedades agonistas de los canales de K (WESTON, 1989).

Queda finalmente por comentar que en nuestros experimentos los efectos, tanto de el buscopán como del alginor, eran prácticamente abolidos en aortas sin endotelio. Ello sugería que parte de sus acciones vasodilatadoras estarían mediadas a través de la liberación de algún factor relajante de origen endotelial. Más aún, dado que la mayoría de los factores relajantes de origen endotelial (NO, EDRF, prostaciclina, nitratos, peptido natriurético atrial, etc) estimulan la actividad de la guanilatociclasa, sería posible que las acciones vasodilatadoras de alginor y buscopan también estuvieran relacionadas con su capacidad para estimular dicha actividad enzimática (FURCHGOTT y cols, 1984).

El endotelio juega un importante papel como modulador del tono vascular y en la agregación plaquetaria (FURCHGOTT y ZAWAZDKI, 1980; FURCHGOTT y cols 1984). La liberación del EDRF se ha demostrado que va precedido de un aumento en la concentración de Ca intracelular ; es decir, que el aumento de la $[Ca]_i$ sería un paso previa para la producción y liberación del EDRF y, por tanto, en los procesos de relajación dependientes del endotelio (LONG y STONE, 1985a,b; VANHOUTTE, 1988). A favor de ello está el hallazgo de que la eliminación del Ca del medio de incubación inhibe la relajación. El origen de este aumento del $[Ca]_i$ parece ser principalmente extracelular, aunque puede haber una pequeña

participación del Ca liberado de un depósito interno (JOHNS y cols, 1987a).

Diversas observaciones han demostrado que la liberación de EDRF desde las células endoteliales es un proceso dependiente de Ca:

a) En cultivos de células endoteliales el ionóforo de Ca, A 23187, produce una relajación endotelio-dependiente y la liberación de EDRF (FURCHGOTT, 1984; COCKS y cols, 1988). Esta relajación se inhibe en un medio carente de Ca (SINGER y PEACH, 1982) y por antagonistas de Ca (SINGER y PEACH, 1982; LONG y STONE, 1985a,b; GRIFFITH y cols, 1986), lo que confirma que la liberación de EDRF está acoplado a la entrada de Ca desde el medio extracelular.

b) Ca y los antagonistas de Ca de tipo dihidropiridínico liberan EDRF (CARVALHO y FURCHGOTT, 1991; RUBANYI y cols, 1985; ROBERTSON, 1986). Sin embargo, los anteriores resultados no son uniformes y algunos autores no encuentran bloqueo en la liberación de EDRF por los antagonistas de Ca (MILLER y cols., 1985; ANGUS y cols, 1989; JAYAKODY y cols, 1987); además, el agonista de los canales de Ca, BAY K 8644 (que abre los canales voltaje-dependientes tipo-L), no produce modificación de la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta torácica de rata (SPEDDING y cols, 1986). Desafortunadamente, desconocemos qué tipo de canales de Ca

son responsables de la entrada de Ca responsable del proceso de liberación de EDRF, e incluso se ha sugerido la posibilidad de que las células endoteliales no poseen canales de Ca voltaje-dependientes (COLDEN-STANFIELD y cols, 1987; MORGAN-BOYD y cols, 1987). Sin embargo, esta afirmación no puede ser mantenida en el momento actual, ya que la existencia de canales de Ca en las células endoteliales ha sido demostrada utilizando la técnica del parche de membrana. En 1989, KASUYA y cols, sugieren que el mecanismo de acción del endotelio se realizaría a través de canales voltaje-dependientes de Ca; utilizando técnicas de binding en arteria la coronaria de cerdo, observaron un lugar de binding distinto al de las dihidropiridinas. Por otra parte, en cultivos de células endoteliales, BK estimula la fosfolipasa C con liberación de un segundo mensajero, IP_3 (DERIAN y MOSKOWITZ, 1986; GANT y cols, 1986; LAMBERT y cols, 1986). Este hecho, junto con la evidencia de que, al menos inicialmente, se necesita Ca intracelular para la liberación de EDRF (LÜCKHOFF y BUSSE, 1986) y que el mantenimiento de la respuesta pueda deberse a la entrada de Ca extracelular, indica que la liberación del EDRF es un proceso similar al descrito para otras células secretoras (WILLIAMSON, 1986; BERRIDGE, 1987). Además del Ca, el oxígeno, es también necesario para la liberación de EDRF (FURCHGOTT y ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1984). El oxígeno es preciso para la síntesis de NO y/o para el acoplamiento

agonista-receptor con el mecanismo de liberación de NO (IGNARRO, 1989).

MONCADA y PALMER (1990), sugieren, en humanos, que la formación constante de óxido nítrico por el vaso sería necesario para el mantenimiento del tono vasodilatador y el normal funcionamiento del sistema cardiovascular. Asimismo, el óxido nítrico participaría en los mecanismos de regulación y transmisión celular (MONCADA y cols., 1989).

Dado que el alginor, necesita la presencia de un endotelio funcionalmente activo, cabría esperar que en su mecanismo de acción estuviera involucrado el endotelio funcionante.

Por otra parte sabemos que los receptores muscarínicos M_2 y M_3 están ampliamente distribuidos en el tejido vascular mediando dos tipos de respuestas: contracción directa y relajación indirecta mediada por la liberación de EDRF (VANHOUTTE y SHEPHERD, 1983; MAEDA y cols, 1988; SCHIAVONE y BRAMBILLA, 1991); a la vista de nuestros resultados, (podemos decir que alginor tiene un efecto dependiente de endotelio, puesto que como se aprecia en la figura 25 el efecto es mucho mayor cuando éste presente), bien podemos pensar que un posible mecanismo de acción sería a través de receptores M_3 , dado que este receptores es el que en la mayor parte de las preparaciones modula la respuesta mediada por EDRF (EGLÉN y WHITING, 1990). Este bloqueo de receptores M_3 impediría que

se produzcan toda la cascada de eventos posteriores, estimulación del recambio de fosfatidil inositol por proteína reguladoras (G_p), aumento de la movilización del Ca intracelular y aumento de la entrada de Ca (CHISTIE y NORTH, 1988), que darían lugar a la contracción vascular. Ahora bien, este bloqueo de receptores M_3 a nivel del endotelio no sería suficiente para explicar en su totalidad la acción vasodilatadora de los fármacos estudiados, dado que presentan acciones, si bien es cierto que menores, aun cuando el endotelio no está presente.

Por todo ello pensamos que las acciones vasodilatadoras de los fármacos estudiados, buscopán y alginor, serían debidas a múltiples mecanismos, siendo el más importante su efecto antagonista de calcio.

CONCLUSIONES

1. En la presente Tesis Doctoral hemos comparado, sobre bases equimoleculares, los efectos de dos fármacos, buscopán y alginor, en anillos de arteria aorta de conejo con y sin endotelio.

2. En anillos de arteria aorta con endotelio, ambos fármacos relajan la tensión basal e inhiben inhibían las respuestas inducidas por KCl y la NA. El buscopán era más efectivo frente a la contracción inducida por NA que la inducida por KCl, por el contrario, el alginor era más efectivo para inhibir la contracción inducida por el KCl. Asimismo ambos fármacos relajan las contracciones inducidas por ambos estímulos, siendo igualmente más efectivo el buscopán para relajar las inducidas por NA y el alginor las inducidas por KCl.

3. En anillos de aorta sin endotelio, el alginor inhibe la contracción inducida por el KCl y relaja la contracción inducida por despolarización. Sin embargo, la potencia era significativamente menor a la producida en aortas con endotelio.

4. Ambos fármacos desplazan hacia abajo y hacia la derecha las curvas dosis-respuesta al Ca (1-3 mM), inducidas en anillos de aorta con endotelio incubados en Krebs-O₂Ca y despolarizados con KCl, tras aumentar la concentración de [Ca]_o (4-5 mM) era posible revertir el efecto.

5. Ambos fármacos parecen inhibir la movilización de [Ca]_i desde los depósitos intracelulares (sensibles a noradrenalina).

6. En la arteria aorta de conejo, ambos fármacos inhiben el flujo de entrada de ⁴⁵Ca estimulado por KCl o NA, siendo nuevamente más potente el alginor que el buscopán.

7. Podemos concluir que ambos fármacos, sobre todo el alginor, incluso a concentraciones muy bajas (10⁻¹⁰M), eran capaces de inhibir el flujo de entrada de Ca a través de los VOCs y los ROCs en las fibras musculares lisas vasculares y que éste efecto, podía revertirse al incrementar la [Ca]_o. Además para ejercer su acción vasodilatadora es necesaria la presencia de endotelio, por otra parte ambos fármacos ejercen importantes acciones a nivel intracelular que podrían estar relacionados con su capacidad para inhibir la movilización de [Ca]_i almacenado. En cualquier caso, el resultado final de todos estos efectos sería una disminución de la [Ca]_i y la relajación de la fibra muscular lisa vascular.

BIBLIOGRAFIA

- ACCINELLI, G., OLIVIERI, T., VIBELLI, C. (1978). The effectiveness of a new spasmolytic drug (DA-3177) during the active phase of labour. A double-blind clinical trial. *Acta Ther.* 4, 19-27.
- AKIBA, I., KUBO, T., MAEDA, A., BAJO, H., NAKAI, J., MISHINA, M., NUMA, S. (1988). Primary structure of porcine muscarinic acetylcholine receptor III and antagonists binding studies. *FEBS Lett.* 235, 257-261.
- ANGUS, J.A., SATOH, K., COCKS, T.M. (1986). Selectivity of calcium antagonists on canine large and small coronary arteries. En: *II Asian Pacific Adalat Symposium*. Ed. Kelly, D.T. ADIS Press, 12-27.
- ANGUS, J.A., COCKS, T.M. (1989). Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* 41, 303-351.
- ANWAR-UL, S., GILANI, H., COBBIN; L.B. (1986). The cardioselectivity of Himbacine: a muscarinic receptor antagonist. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332, 16-20
- ARTALEJO, C.R., GARCIA, A.G. (1986). Calcioantagonistas: bases farmacológicas para su manejo clínico. *Farmacoterapia*, 3: 149-162.
- AWANO, K., YOKOYAMA, M., FUKUZAKI, H. (1989). Role of s e r o t o n i n , histamine and tromboxane A_2 in platelet-induced contractions of coronary arteries and aortae from rabbits. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13, 781-792.
- BARRIGON, S., TEJERINA, T., DELGADO, C., TAMARGO, J. (1984). Effects of chlorbutol on ^{45}Ca movements and contractile responses of rat aorta and its relevance to the actions of syntocinon. *J.Pharm.Pharmacol.* 36, 521-526.
- BARRIGON, S., DIEZ, J.J., TAMARGO, J., TEJERINA, T. (1985). Effects of pincaïnide on contractile responses and ^{45}Ca movements in rat isolated vascular smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* 111, 227-233.
- BAUER, R., GROSS, E., SCARSEILLI, V., STOCKHAUS, K., WICK, H. (1968). On the differences of effect of atropine, scopolamine and some of their quaternary derivatives after subcutaneous and enteral administration with special reference to scopolamine-n-butylbromide. *Arzneimittel Forschung Sep 18(9)*, 1132-1137.

- BAUER, K.M. (1987). Untersuchungen ueber die Beeinflussung von Harnblasenruhetonus, Maximaler Blasen-Kapazitaet und Miktionsdruck durch oral. Gegebenes Buscopan (Clinical Report).
- BEAN, B.P. (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Physiol.*, 51: 367-384.
- BENGA, G. (1985). Structure and properties of cell membranes. In: George Benga, ed. CRC Press, Vol. I, II, III.
- BENHAM, C.D., HESS, P., TSIEN, R.W. (1987). Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ.Res.* 61(suppl 1), 1-16.
- BENHAM, C.D., TSIEN, R.W. (1988). Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J. Physiol.*, 404: 767-784.
- BENHAM, C.D. (1990). Vascular smooth muscle calcium channels. *Eur.J.Pharmacol.* 183, 9.
- BENITO, F., GONZALEZ, C., (1953). Fármacos. Enciclopedia de Medicamentos y Especialidades. 1ª Edición. pg. 646.
- BERLE, F. (1974). Pharmakologische und Toxikologische. Pruefung von Buscalide tabletten and Ratte und Hund 10, 1.
- BERRIDGE, M.J. IRVINE, R.F. (1984). Inositol Triphosphate, a novel second messengers. *ISI Atlas Sca. Pharmacol.* 1, 91-97.
- BERRIDGE, M.J. (1986). Calcio: Un segundo mensajero universal. *Triangulo*, 24: 77-89.
- BERRIDGE, M.J. (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *ISI Atlas Sci. Pharmacol.* 1, 91-97.
- BIRDSALL, N.J., CHAN, S.C., EVELEIGH, P., HULME, E.C., MILLER, K.W. (1989). The modes of binding of ligands to cardiac muscarinic receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 10 (suppl), 31-34.
- BOLTON, T.B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol.Rev.* 59, 606-718.
- BOLTON, B.T., LIM, S.P., SALMON, D.M.W., BEECH, D.J. (1988). Calcium channels and calcium-mediated effects in smooth muscle cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 3(suppl 5), S96-S99.

- BONNER, T.I., BUCKLEY, N.J., YONG, A.C., BRANN, M.R. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527-532.
- BONZI, G., REGUZZONI, G., ROCCA, F., NEGRI, L. (1979). DA 3177, nuovo spasmolitico di sintesi, nella terapia degli stati spastici e discinetici dell'apparato digerente. *Clin.Terapeut.* 89, 187-196.
- BOWMAN y RAND, (1984). Mecanismos colinérgicos autónomos periféricos. En: *Farmacología: Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. II Edición.* pg. 10.1-10.35. Editorial Interamericana.
- BRIGGS, A.H. (1962). Calcium movement during potassium contracture in isolated rabbit aortic strips. *Am.J.Physiol.* 203, 849-852.
- BROWN, B.R., CROUT, J.R. (1970). The sympathomimetic effects of gallamine on the heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 172, 266-273.
- BROWN, A.M, YATANI, A., LACERDA, A.E., GURNOLA, G.B., POSSANI, L.D. (1987). Neurotoxins that act selectively on voltage-dependent cardiac calcium channels. *Circ. Res.*, 61: 16-19.
- BROWN, A.M., BIRNBAUMER, L. (1988). Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.*, 254 (Heart Circ. Physiol. 23): H401-410.
- BULLOCH, G.R., TAYLOR, S.G., WESTON, A.H. (1986). Influence of the vascular endothelium on agonist induced contractions and relaxations in rat aorta. *Br.J.Pharmac.* 89, 819-820.
- BÜLBRING, E., TOMITA, T. (1987). Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, 39: 49-96.
- CAMPBELL, A.K. (1985). *Intracellular calcium, its universal role as regulator.* Chichester: Wiley and Sons.
- CARVALHO, R.A., FURCHGOTT, R.F. (1981). Vasodilation of the rabbit mesenteric vascular bed by acetylcholine and A-23187. *Pharmacologist.* 23, 223-232.
- CASADIO, S., DONETTI, A. (1974). Certain N-substituted scopalammonium compounds. *VS Patent* 3, 853.
- CAUVIN, C., LOUTZENHISER, R., VAN BREEMEN, C. (1983). Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 23, 373-396.

- CAUVIN, C., LUKEMAN, S., CAMERON, J., MEISHERI, K., YAMAMOTO, H., VAN BREEMEN, C. (1984). Theoretical bases for vascular selectivity of calcium antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6: S630-S638.
- CAUVIN, C., VAN BREEMEN, C. (1985). Different Ca^{2+} channels along the arterial tree. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7(suppl 4), S4-S10.
- CHRISTIE, M.J., NORTH, R.A. (1988). Control of ion conductances by muscarinic receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 9(suppl), 30-34.
- CHRISTIE, M.J., GRIFFITH, T.M., LEWIS, M.J. (1989). A comparison of basal and agonist-stimulated release of endothelium-derived relaxing factor from different arteries. *Br. J. Pharmacol.* Oct. (2), 397-406.
- COCKS, T.M., ANGUS, J.A., LITTLE, P.J., CAMPBELL, J.H., GRAGOE, E.J. Jr. (1988). Amiloride analogues cause endothelium-dependent relaxation in the canine coronary arteries "in vitro": possible role of Na^+/Ca^{2+} exchange. *Br. J. Pharmacol.* 95, 67-76.
- COLDEN-STANFIELD, M., SCHILLING, N.P., RITCHIE, A.K., ESKIN, S.G., NAVARRO, L.T., KUNZE, D.L. (1987). Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic current in cultured bovine aortic endothelial cells. *Cir. Res.* 61, 632-640.
- COOK, P.J., BENNET, P., WARNES, T., LENNARD, J. (1984). A randomized double-blind trial of four different premedication regimens for upper intestinal endoscopy. *Gut* 15, 842.
- CRUZ, L., JOHNSON, D., OLIVERA, B. (1987). Characterization of the w-conotoxin target. Evidence for tissue-specific heterogeneity in calcium channel types. *Biochemistry*, 26: 820-824.
- DANIOTTI, S., IMBIMBO, B.P., MUZIO, F., PIPERNO, A., FIORELLI, G. (1986). Urinary elimination by man of cimetropii bromidium, a new anti-spasmodic drug after repeated oral doses, new products, new packs, new presentations, Part IV. *Acta Pharmacol. Toxicol. Copenh.* 59(suppl 5), 208: Abstr. 619.
- DE MICHELE, M., COVALLOTTI, C., FELICI, L., RICCI, A., AMEUTA, F. (1987). Are muscarinic receptors present in rat pial or intracerebral vessels? *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 300, 85-93.

- DERIAN, C.K., MOSKOWITZ, M.A. (1986). Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. *J.Biol.Chem.* 261, 3831-3837.
- DESHPANDE, S. (1976). Rebound effect of hyoscine butylbromide on postoperative bowel contractions. *Br.Med.J.* 13.1(-6010), 646-647.
- DI FRANCESCO, D., DUCOURET, P., ROBINSON, R.B. (1989). Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 243, 669-671.
- DOODS, H., MATHY, M.J., DAVIDESKO, D., VAN CHARLDOR, P., KARIN, J., JONGE, A., VAZ ZWIETEN, P.A. (1987). Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M_1 , M_2 and M_3 receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 242(1), 257-262.
- DOODS, H.N., DAMMGER, J., MAYER, N., RINNER, I., TZACH, V. (1989). Muscarinic receptor in the heart and vascular system. *Prog.Pharmacol.Clin.Pharmacol.* 7, 47-72.
- DROOGMANS, G., RAEYMAEKERS, L., CASTEELS, R. (1977). Electromechanical and pharmacomechanical coupling in the rabbit ear artery. *J.Gen.Physiol.* 70, 129-148.
- DROOGMANS, G., CASTEELS, R. (1984). Electromechanical and pharmacomechanical coupling in smooth muscle. En: *Pharmacology of the Vascular Wall*. Ed. J.Esplugues, pag. 65-80. University Press. Valencia.
- DUCKLES, S.P., YAMAMURA, H.I., LEE, V. (1987). AF-DY 116 discriminates between muscarinic M_2 receptors of the heart and vasculature. *Life Sci.* 40, 1507-1511.
- DUCKLES, S.P. (1988). Vascular muscarinic receptors: Pharmacological characterization in the bovine coronary artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 246(3), 929-934.
- DUNN, D.C., KUBIN, R.H., LAING, P.R., SISK, C.W., KLOTZ, A.P. (1970). Double-blind study of endoscopy premedication. *Gastrointestinal Endoscopy* 16, 229.
- EGLLEN, R.M., WHITING, R.L. (1985). Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilatation. *Br.J.Pharmacol.* 84, 3-5.
- EGLLEN, R.M., MONTGOMERY, W.W., DAINTY, I.A., DUBUQUE, L.K., WHITING, R.L. (1988). The interaction of methocramine and himbacine at atrial, smooth and endothelial muscarinic receptors in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 95, 1031-1038.
- EGLLEN, R.M., WHITING, R.L. (1990). Heterogeneity of vascular muscarinic receptors. *J.Auton.Pharmacol.* 19, 233-245.

- FABBRO, L., del, BARTOLOMEO, C. di, GRASSI, L., LESTUZZI, A., PERRARO, F., TOSOLINO, G. (1977). Study of a new spasmolytic drug (DA-3177) in emergency medicine. *Clin.Ter.* 83, 609-623.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1972). Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemma. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ.Res.* 31, 293-301.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Ann.Rev.Physiol.* 41, 473-483.
- FERRARI, W. (1973). Indagine tossicologica e farmacologica su un'associazione di novalgina, butilbromuro di ioscina e prometazina. *Preclinical report* 3, 3.
- FIGLIOLI, G., PIPERNO, A., MANOUSSAKIS, C., DANIOTTI, S., MUZIO, F., IMBIMBO, B.P. (1986). Lack of hemolytic effects of cimetropium bromide, a new antispasmodic agent, in humans. *Acta Pharmacol.Toxicol.Copenh.* 59(suppl 5), 168:Abstr. 114.
- FISHER, S., BATUS, R.T. (1985). Regional differences in the coupling of muscarinic receptor to inositol phospholipid hydrolysis in guinea-pig brain. *J.Neurochem.* 45, 1085-1095.
- FLAVAHAN, N.A., SHIMOKAWA, H., VANHOUTTE, P.M. (1989). Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxation to certain agonists in porcine coronary arteries. *J.Physiol.* 408, 549-560.
- FLECKENSTEIN, T., (1983). Calcium antagonism in heart and smooth muscle. New York. John Wiley Sons.
- FORNAPIERO, E., BARONE, A., FRANCOLINI, G., PUPITA, F. (1990). Clinical experience with an anticholinergic spasmolytic cimetropium bromide in the treatment of patients with renal colic.
- FÖRSTERMANN, U., ALHEID, U., FRÖLICH, J.C. MÜLSCH, A. (1988). Mechanisms of action of hypoxigenase and cytochrome P-450-mono-oxygenase inhibitors in blocking endothelium-dependent vasodilation. *Br.J.Pharmacol.* 93, 569-578.
- FRIGERIO, A., TEMPORELLI, A., IMBIMBO, B.P., MUZIO, F. (1986). Cimetropium bromide as a relaxant for the radiological examination of the stomach and duodenum. *Curr.Med.Res.Opin.* 10, 319-325.
- FUENTE, P. DE LA (1980). Control y valoración de la influencia del TH 1165A sobre la dinámica del parto mediante tocografía interna (serie de 13 casos) *Clinical report.*

- FUKUDA, K., KUBO, T., AKIBA, I., MAEDA, A., MISHINA, M., NUMA, S. (1987). Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Nature* 327, 623-625.
- FURCHGOTT, R.F., BHADRAKOM, S. (1953). Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 108, 124-143.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- FURCHGOTT, R.F. (1984). The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann.Rev.P-harmacol.Toxicol.* 24, 175-197.
- FURCHGOTT, R.F., CHERRY, P.D., ZAWADZKI, J.V., JOTHIANANDAN, D. (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 6(suppl 2), S336-S343.
- GANT, P., DAVIES, P.F., LEOPOLD, J.A., GIMBRONE, M.A., ALEXANDER, R.W. (1986). Short en long term interactions of endothelium and vascular smooth muscle in culture: Effects on cyclic GMP production. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83, 3552-3556.
- GIACHETTI, A., MICHELETTI, R., MONTAGNA, E. (1986). Cardioselective profile of AF-DX 116 a muscarinic M₂ receptor antagoist. *Life Sci.* 38, 1663-1672.
- GIL, D.W., WOLFE, B.B. (1985). Pirenzapine distinguishes between muscarinic receptor-mediated phosphoinositide breakdow and inhibition of adenylate cyclase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 232, 608-616.
- GODFRAIND, T., KABA, A., (1969). Blockade or reversal of the contraction induced by calcium adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 36,549-560.
- GODFRAIND, T. (1976). Calcium exchange in vascular smooth muscle action of noradrenaline and lanthanum. *J.Physiol.* 260, 21-35.
- GODFRAIND, T., DIEU, D. (1981). The inhibition by flunarizine of the norepinephrine-evoked contraction and calcium influx in rat aortae and mesenteric arteries. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 217, 510-515.
- GODFRAIND, T., MILLER, R.C., SOCRATES LIMA, J. (1982). Selective alpha₁ and alpha₂-adrenoceptor agonist-induced contractions and ⁴⁵Ca fluxes in the rat isolated aorta. *Br.J.Pharmac.* 77, 597-604.

- GODFRAIND, T., MILLER, R. (1983). Specificity of action of Ca^{++} entry blockers. A comparison of their actions in rat arteries and in human coronary arteries. *Cir.Res.* 52(I), 81-91.
- GODFRAIND, T., MILLER, R.C., WIBO, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol.Rev.* 38, 321-416.
- GOETZKE, E., MONNERJAHN, J. (1983). Pruefung der Hemmwirking von Boscopan i.v (9,15, 0.30, 0.60 mg/kg) auf die durch cholecystokinin Ausgeloeste Kontraktion und Entleerungskinetik der Gallenblase Phase IV 5,5. 1983. Pruefer: Privatdozent Dr.Med.Th. Wagrner, Luebeck.
- GOODMAN, A., GOODMAN, L., RALL, T., MURAD, F. (1991). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Eds. Goodman, G. Panamericana. Madrid, pag. 139-152.
- GORDON, A. (1978). Contraction of detergent-treated smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75, 3527-3530.
- GOTO, K., KASUYA, Y., MATSUKI, N., TAKUWA, Y., KURIHARA, H., ISHIKAWA, T., KIMURA, S., YANAGISAWA, M., MASAKI, T. (1989). Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 3915-3918.
- GOVONI, S., BATTIANI, F., MAGNONI, S., LUCCHI, L., RIUS, R., TRABUCCHI, M. (1988). Plasticity of neuronal L-type calcium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 522: 187-188.
- GOVONI, S. (1990). El calcio en la fisiopatología del sistema nervioso central. Ed. M.C.R. Barcelona.
- GOYAL, R.K. (1989). Muscarinic receptor subtypes. *Physiology and clinical implications.* *New Engl.J.Med.* 321, 1022-1029.
- GRIFFITH, T.M., EDWARDS, D.H., LEWIS, M.J., NEWBY, A.C., HENDERSON, A.H. (1984). The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308, 645-647.
- GRIFFITH, T.M., EDWARDS, D.H., NEWBY, M.C., LEWIS, M.J., HENDERSON, H.H. (1986). Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracelular calcium. *Cardiovasc.Res.* 20, 7-12.
- GROSSMAN, A., FRUCHGOTT, R. (1964a). The effects of external calcium concentration on the distribution and exchange of calcium in resting and beating guinea-pig auricles. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 147, 107-119.

- GROSSMAN, A., FURCHGOTT, R. (1964b). The effects of frequency of stimulation and calcium concentration on ^{45}Ca exchange and contractility on the isolated guinea-pig auricle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 143, 120-130.
- GUIGNARD, J.P., HERXHEIMER, A., GREENWOOD, R.H. (1968). Effects of hyoscine butylbromide on gut motility. *Clin. Pharmacol. Ther.* 9(6), 745-748.
- GUSLANDI, M. (1990). Drug therapy of irritable colon: critical analysis. *Gastroenterology* 6, 162-164.
- HAGIWARA, N., IRISAWA, H., KANEGAMA, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J.Physiol.* 395, 233-253.
- HAEUSLER, G., RICHARDS, J.G., THORENS, S. (1981). Noradrenaline contractions in rabbit mesenteric arteries skinned with saponin. *J.Physiol.* 321, 537-556.
- HAEUSLER, G., DE PEYER, J.E. (1989). Rabbit aorta: Electrical properties and agonist-induced depolarization. *Eur. J. Pharmacol.*, 166: 175-182.
- HAMMER, R., BERRIE, C.P., BIRDSALL, N.J.M., BURGEN, A.S.V., HULME, E.C. (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283, 90-92.
- HAMMER, R., GIACHETTI, A. (1984). Selective muscarinic receptor antagonists. *Trend.Pharmacol.Sci.* 5, 18-20.
- HAULEY, R.M., STEINER, A. (1990). El sistema del segundo mensajero para hormonas peptídicas. *Hospital Practice (Ed. Española)* 5(1), 9-22.
- HELLSTRÖM, R., ROSEN, A., SODERLUN, K. (1979). The gastrointestinal absorption and the excretion of H^3 -butylscopolamine (hyoscine butylbromide) in man. *Scand.J.Gastroenterol.* 5(7), 585-592.
- HEINKEL, K. (1951). Investigations on the pharmacological effects and clinical applications of hyoscine butylbromide (Buscopan). *Dtsch Zverdauer Stoffwechselkr* 11, 180-191.
- HEINKEL, R., CARVALHO, D.G. (1959). Determination of therapeutic effectiveness in acute pancreatitis (experimental animal studies). 1. Methodology and influence of blood amylase. *Exp.Med.* 131, 155-173.
- HERXHEIMER, A., HAEFELI, L. (1966). Human pharmacology of hyoscine butyl bromide. *Lancet* 2, 418-421.

- HESTER, K.R., SATAKE, N., SHIBATA, S., VEDA, S., YAMAHARA, J. (1986). The mode of vasorelaxant action of 2-aminoisoquinoline, 1.3 (2H.4H)-dione, a novel "intracellular calcium inhibitor". *Br.J.Pharmac.* 87, 387-397.
- HESTER, K.R., O'CONNOR Jr., D.E., BECKER, R.J. (1987). Effects of nicorandil on receptor-mediated Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle. *J.Cardio-vasc.Pharmacol.* 10(suppl 8), S44-S48.
- HESS, P., LANSMAN, J.B., TSIEN, R.W. (1984). Different modes of Ca channel gating behaviour favored by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature*, 311: 538-544.
- HINKE, J.A.M., WILSON, M.L., BURNHAM, H.R. (1964). Calcium and the contractility of arterial smooth muscle. *Am.J.P-hysiol.* 206, 211-217.
- HINKE, J.A.M. (1965). Calcium requirements for noradrenaline and high potassium ion contraction in arterial smooth muscle. En: Pual WM, Daniel EE, Kay CM y Monckton G. *Muscle*. Oxford, Pergamon pag. 269-284.
- HOFKIN, G.A. (1969). Simplified anesthesia for peroral endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* 16, 38.
- HOFMANN, F., NASTAINCZYK, W., ROHRKASTEN, A., SCHNEIDER, T., SIEBER, M. (1987). Regulation of the L-type calcium channel. *Trends Pharmacol.Sci.* 98, 393-398.
- HOHLFELD, U., LIEBAU, S., FÖRSTERMANN, U. (1990). Pertussis toxin inhibits contraction but not endothelium-dependent relaxations of rabbit pulmonary artery in response to acetylcholine and other agonists. *Pharmacol.Exp.Ther.* 252,260-264.
- HONDENGHEM, L.M., KATZUNG, B.G. (1984). Antiarrhythmic agents: The modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 24, 387-423.
- HOUKANEU, R.E., ABDEL-LATIL, A.A. (1988). AF-DX 116 discriminates between muscarinic M_2 receptor of the heart and the iris smooth muscle. *Mol.Cell.Biochem.* 82, 131-132.
- HUDGINS, P.M., WEISS, G.B. (1968). Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 159, 91-97.

- HUPSCHER, D.N., DOMMERHOLT, O. (1984). Action and side effects of small doses of buscopan in gastroduodenal radiography. A prospective study in 300 patients. *Diagn.Imaging Clin.Med.* 53(2), 77-86.
- HURWITZ, L. (1986). Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 26, 225-258.
- IGNARRO, L.J., KADOWITZ, P.J. (1985). The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 25, 171-191.
- IGNARRO, L.J. (1989). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ.Res.* 6, 1-21.
- IMBIMBO, B.P., DANIOTTI, S., VIDI, A., FOSCHI, D., SAPORITI, F., FERRANTE, L. (1986). Discontinuous oral absorption of cimetropium bromide, a new antispasmodic drug. *J.Pharm.-Sci.* 75, 680-684.
- IMBIMBO, B.P., GARDINO, L., PALMAS, F., FRASCIO, M., CANEPA, G., SCARPIGNATO, C. (1990). Different effects of atropine and cimetropium bromide on gastric emptying of liquids and antroduodenal motor activity in man. *Hepatogastroenterology* 87, 242-246.
- INSTITUTO DE ANGELLI. Dirección de Investigación (1973). Relación toxico-farmacológica por el Ministerio de Sanidad. Milan (Italia).
- JANIS, R., SILVER, P., TRIGGLE, D. (1987). Drug action and cellular calcium regulation. *Adv. Drug Res.*, 16: 309-391.
- JAYAKODY, R.L., KAPPAGODA, C.T., SENARATNE, M.P.J., SREENARAN, M. (1987). Absence of effect of calcium antagonists on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Br.J.Pharmacol.* 91, 155-164.
- JONKMAN, J., VAN BORK, I., WIJSBEEK, J., DE ZEEUW, R.J., ORIE, N. (1977). Variations in the bioavailability of thiazinamium methyl sulfate. *Clin.Pharmacol.Ther.* 21, 457-563.
- JUNG, S.H., KIM, M.H., MIN, Y.H. (1992). use of Cimetropium bromide in irritable bowel syndrome patients. *New Med.J.* 35 (7), 5917.
- KAJBAF, M., JAHANSHAHI, M., PATTICHIS, K., GORROD, J.W. (1991). The in vitro metabolism of a new anticholinergy drug: cimetropium bromide. *Prog.Pharmacol.Clin.Pharmac.* 8(3), 41-48.

- KAJBAF, M., SEPAI, O., LAMB, J.H., NAYLOR. (1992). Identification of metabolites of 4,4'-diaminodiphenylmethane using liquid chromatographic and mass spectrometric techniques. *J.Chromatogr.* 583(1), 63-67.
- KAMEYAMA, M., HESCHELER, J., HOFMANN, F., TRAUTWEIN, W. (1986). Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. *Pfluegers Arch.*, 407: 123- 128.
- KARAKI, H., WEISS, G.B. (1979). Alterations in high and low affinity binding of ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to Lanthanum and low temperature. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 211: 86-92.
- KILBINGER, H., HALIM, S., LAMBRECHT, G., WEILER, W., WESSLER, I. (1984). Comparison of affinities of muscarinic antagonists to pre- and postjunctional receptors in the guinea-pig ileum. *Eur.J.Pharmacol.* 103, 313-320.
- KRAMER, G., HARDMAN, J. (1980). Cyclic nucleotides and blood vessel contraction. In: Bohr, D.F., Somlyo, A., Sparks, H.V., eds. *Handbook of Physiology. Vol. 2. The Cardiovascular System.* Bethesda Md: American Physiological Society. 179-199.
- LAMBERT, T.I., KENT, R.S., WHORTON, A.R. (1986). Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 293, 15288-15293.
- LANDINSKY, H., GIRALDO, E., MOUFERINI, E., SCHIAVI, G.B., VIGANO, M.A., DE CONTI, L., MICHELETTI, R., HAMMER, R. (1988). Muscarinic receptor heterogeneity in smooth muscle: binding and functional studies with AF-DX 116. *Trends Pharmacol.Sci.* 9(suppl), 44-48.
- LANGILLE, L., O'DONNELL, F. (1986). Reduction in arterial diameter produced by chronic decrease in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231, 405-407.
- LANFRANCHI, G.A., BAZZOCCHI, G., CAMPIERI, N., BRIGNOLA, C., FOIS, F., IMBIMBO, B.P. (1988). Reduction by cimetropium bromide of the colonic. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 33, 571-575.
- LECHLEITER, J., PERALTA, J., CLAPHAM, D. (1989). Diverse function of muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Trends Pharmacol.Sci.* 10(suppl), 34-38.

- LEE, J.R. (1982). Routine use of hyoscine N-butyl bromide (Buscopan) in double contrast barium enema examinations. *Clin.Radiol.* 33(3), 273-276.
- LEWIS, R., CAHALAM, M. (1990). Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Ann. Rev. Physiol.*, 52: 415- 430.
- LITTA-MODIGNARI, R., MAZZOLARI, M., BARANTANI, E., BERTOLI, D., VIBELLI, C. (1977/78). Relative potency of the atropine like effects of a new parasympatolytic drug scopolamine N-(cyclopropyl methyl)-bromide and those of hyoscine N butylbromide. *Curr.Med.Res.Opin.* 5, 333-340.
- LONDONG, W. (1982). Anticholinergics for peptic ulcer-a renaissance? *Hepato-gastroenterol.* 24, 40.
- LONG, G.J., STONE, T.W. (1985a). The release of endothelium derived relaxant factor is calcium dependent. *Br.J.Pharmac.* 84(suppl 1), 152P.
- LONG, C.J., STONE, T.W. (1985b). The release of endothelium-dependent relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 22, 205-208.
- LOUIE, D.S., OWYANG, C. (1986). Muscarinic receptor subtype on rat pancreatic acini: secretion and binding studies. *Am.J.Physiol.* 251, 6275-6279.
- LOUTZENHINSER, R., LEYTEN, P., SAIDA, K., VAN BREEMEN, C. (1985). Calcium compartments and mobilization during contraction of smooth muscle. En: Grover, A.K. y Daniel, E.E. *Calcium and Contractility: Smooth Muscle*. Clifton (New Jersey). Humana Press, p. 61-92.
- LLINAS, R., SUGIMORI, M., LIN, J.W., CHERKSEY, B. (1989a). blocking and isolation of calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86: 1689-1693.
- LLINAS, R., SUGIMORI, M., CHERKSEY, B. (1989 b). Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P Channel. *Calcium Channels. Structure and Function*. Eds. Wray, D., Norman, R., Hess, P. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 560, 103-111.
- LÜCKHOFF, A., BUSSE, R. (1986). Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides. *J.Cell.Physiol.* 126, 414-420.

- MADISON, J.M., JONES, C.A., TOM-MOY, M., BROWN, J.K. (1987). Affinities of pirenzepine for muscarinic cholinergic receptors in membranes isolated from bovine tracheal mucosa and smooth muscle. *Am.Rev.Respir.Dis.* Mar. 153(3), 719-724.
- MAEDA, A., KUBO, T., MISHINA, M., NAMA, S. (1988). Tissue distribution of mRNA encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.* 239, 339-342.
- MANGANELLI, A., ACCONCIA, A. (1977). Clinical study of the spasmolytic activity of Da-3177 in urology. *Urologic* 44, 1-9.
- MARAZZI-UBERTI, E. (1973). Pharmacological properties and acute toxicity of DA 3177, a new parasymaptholytic drug. Report of the Research Department of the Instituto de Angeli to the Italian Ministry of Health.
- MARIN, Y., SANCHEZ-FERRER, C.F. (1990). Role of endothelium formed nitric oxide on vascular responses. *Gen.Pharmacol.* 21: 575-587.
- MARTY, A. (1989). The physiological role of calcium-dependent channels. *TINS.*, 12: 420-424.
- MCDONALD, T., PELZER, D., TRAUTWEIN, W. (1989). Dual action (stimulation, inhibition) of D600 on contractility and calcium channels in guinea-pig and cat heart cells. *J. Physiol. Lond.*, 414: 569-586.
- McCLESKEY, E.W., FOX, A.F., FELDMAN, TSIEN, R.W. (1986). Different types of calcium channels. *J.Exp.Biol.* 124, 177-190.
- McKINNEY, M., RICHELSON, E. (1984). The coupling of neuronal muscarinic receptor to responses. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 24- 121-146.
- MARTIN, W., VILLANI, G., JOTHIANANDAN, D., FURCHGOTT, R.F. (1985). Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryltrinitate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J.Pharmacol-Exp.Ther.* 232, 708-716.
- MARTIN, W., FURCHGOTT, R.F., VILLANI, G.M., JOTHIANANDAN, D. (1986). Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 237, 539-547.

- MEINERTZ, T., NAWRATH, H., SCHOLZ, H. (1973a). Adrenaline DB-cAMP and myocardial ^{45}Ca exchange. Comparative studies in rat and guinea-pig auricles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 279, 313-325.
- MEINERTZ, T., NAWRATH, H., SCHOLZ, H. (1973b). Stimulatory effects of DB-c-AMP and adrenaline on myocardial contraction and ^{45}Ca exchange. Experiments at reduced calcium concentration and low frequencies as stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 279, 327-338.
- MEISHERI, K., PALMER, R., VAN BREEMEN, C. (1980). The effects of Amrinone on contractility, Ca^{++} uptake and cAMP in smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* 61, 159-165.
- MEISHERI, K., NWANG, O., VAN BREEMEN, C. (1981). Evidence for two separate Ca^{2+} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J.Membrane Biol.* 59, 19-25.
- MELCHIORRE, C., CASSINELLI, A., QUAGLIA, W. (1987). Differential blockade of muscarinic receptor subtypes by polymethylene tetraamines. Novel class of selective antagonists of cardiac M_2 muscarinic receptors. *J.Med.Chem.* 30, 201-204.
- MELDOLESI, J., POZZAN, T. (1987). Pathways of Ca influx at the plasma membrane: Voltage-receptor, and second messenger operated channels. *Exp. Cell. Res.*, 171: 271-283.
- MELDOLESI, J., CLEMENTI, E., FASOLATO, C., ZACCHETTI, D., POZZAN, T. (1991). Ca^{2+} influx following receptor activation. *TIPS.*, 12: 289-292.
- MESSERLI, F. (Ed.) (1990). Cardiovascular drug therapy. Londres: WB, Saunders Co.
- MICHELETTI, R., MORTAGNA, E., GIACHETTI, R. (1987). AF-DX 116 a cardioselective muscarinic antagonist. *J.Pharmacol-Exp.Ther.* 241: 628-634.
- MILLER, R.C., SCHOEFFTEZ, P., STOCLET, J.C. (1985). Sensitivity of calcium-dependent endothelial stimulation in rat isolated aorta to the calcium entry, flunarizine. *Br.J.Pharmacol.* 85, 481-487.
- MILLER, V.M., VANHOUTTE, P.M. (1988). Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *Am.J.Physiol. Sep.* 255(3 Pt2), H446-451.
- MIYOSHI, A., SUYAMA, T., KAWAMURA, I. (1977). A double-blind comparative study of the inhibitory effect of intraduodenally administered hyoscine-N-butylbromide on human duodenal motility. *J.Int.Med.Res.* 5(4), 223-232.

- MOLLER, J., ROSEN, A. (1968). Comparative studies on intramuscular and oral effective doses of some anticholinergic drugs. *Acta Med.Scand.* 183(5), 201-209.
- MONCADA, S. (1986). Producción de prostaciclina y del factor de relajación derivado del endotelio a partir de células endoteliales. *Rev.Clin.Esp.* 179(6), 323-328.
- MONCADA, S., HERMAN, A.G., VANHOUTTE, P. (1987). Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol.Sci.* 98, 365-368.
- MONCADA, S., RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J. (1988). Endothelium-derived relaxing factor; identification as nitric acid and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem.Pharmacol.* 37, 2495-2501.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem.Pharmacol.* 38, 1709-1715.
- MONCADA, S., PALMER, R.J.J. (1990). The L-arginine: nitric oxide pathway in the vessel wall. In: *Nitric Oxide from L-arginine: a Bioregulatory System*. Ed. S. Moncada, Elsevier (Londres).
- MOREL, N., GODFRAIND, T. (1987). Prolonged depolarization increases the pharmacological effects of dihydropyridines and their binding affinity for calcium channels of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 243: 711-715.
- MORGAN-BOYD, R., STEWART, J.M., VAUREK, R.J., HASSID, A. (1987). Effect of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelial cells. *Am.J.P-hysiol.* 253, C588-C589.
- NAYLER, W. (1988). *Calcium antagonists*. Oxford: Academic Press.
- NEHER, E. (1987). Receptor-operated channels. *Nature*, 326: 242-246.
- NELSON, M.T., STANDEN, N.B., BRAYDEN, J.E., WORLEY, J.F. (1988). Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 336: 382-385.
- NELSON, M.T., PATLAK, J.B., WORLEY, J.F., STANDEN, N.B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. P-hysiol.*, 259: C3-C18.

- NISHIKAWA, M., HIDAKE, H., ADELSTEIN, R. (1983). Phosphorylation of smooth muscle heavy meromyosin by calcium-activated, phospholipid dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 258, 14069-14072.
- NOWYCKY, M.C., FOX, A.P., TSIEN, R.W. (1985a). Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist BAY K 8644. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 2178-2182.
- NOWYCKY, M.C., FOX, A.P., TSIEN, R.W. (1985b). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (Lond.)* 316, 440-443.
- PACAUD, P., LOIRAND, G., BARON, A., MIRONNEAU, CH., MIRONNEAU, J. (1991). Ca^{2+} channel activation and membrane depolarization mediated by Cl^{-} channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 1000-1006.
- PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- PANDOLFO, N., SPIGNO, L., BENSI, G., ZAPPATORE, F., DANIOTTI, S. (1990). Effects of oral cimetropium bromide on esophageal motility in healthy subjects and in symptomatic patients. *Curr.Ther.Res.* 48(6), 1012-1020.
- PAPPANO, A.J., MATSUMOTO, K., TAJIMA, T., AGNARSSON, U., WEBB, W. (1988). Pertussis toxin-insensitive mechanism for carbachol-induced depolarization and positive inotropic effect in heart muscle. *Trends Pharmacol.Sci.* 9(suppl), 35-39.
- PARENTE, F., LAZZARONI, M., IMBIMBO, B.P., PANZA, E., ARDIZZONE, S., BIANCHI-PORRO, G. (1985). The use of cimetropium bromidum as premedication for endoscopy of the upper gastro-intestinal tract: a double-blind controlled clinical trial. *J.Int.Med.Res.* 13, 332-337.
- PARNAVELA, J.G., KELLY, W., BURNSTOCK, G. (1985). Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature* 316, 724-725.
- PASSARETTI, S., GUSLANDI, M., IMBIMBO, B.P., DANIOTTI, S., TITTOBELLO, A. (1989). Effects of cimetropium bromide on gastrointestinal transit time in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 3, 267-276.

- PENTIKAINEN, P., PENTTILÄ, A., VAPAATALO, H., HACKMAN, R. (1973). Intestinal absorption, intestinal distribution, and excretion of labelled hyoscine N-butylbromide (Gutypscopolamine) in the rat. *J.Pharm.Pharmacol.* May 25(5), 371-375.
- PETERS, TH. (1988). Mecanismos basicos de la homeostasis del calcio celular. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, suppl 460, 7-12.
- PIAI, G., VISCONTI, M., MINIERI, M., SOLLAZZO, R., MAZZACCA, G., IMBIMBO, B.P. (1986). Treatment of irritable bowel syndrome. A double-blind cross-over trial of cimetropium bromide (alginor) v. prifinium bromide. *Clin.Trials J.* 23, 6-10.
- POZO, M.J., SALIDO, M.D., MADRID, J.A., SALIDO, G.M. (1990). In-vitro effect of pirenzepine on motility of canine gall-bladder. *J Pharm Pharmacol.* 42(2), 89-93.
- PREUNER, J. (1981). Ca-homeostasis. In: *Cardiac Muscle Cell: An active Ca-pump and its Functional Dependence on Plasma-Membrane Bound Ca.*
- RASMUSSEN, H., TAKAWA, Y., PARK, S. (1987). Protein kinasa C in the regulation of smooth muscle contraction. *Faseb J.* 1, 177-185.
- RESIDORI, P., BATTOCCHIA, A., BITI, L., SORDI, F., NEGRI, L. (1978). Controlled double-blind trial of a new synthetic spasmolytic in the relief of gastroenteric pain. *Gazz.-Med.Ital.* 137(22), 569-574.
- REUTER, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters enzymes and drugs. *Nature* 301, 569-574.
- REYNOLDS, J., WAGNER, J., SNYDER, S., THAYER, S., OLIVERA, B., MILLER, R. (1986). Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by w-contoxin GVIA. *Proc. Nat.Acad. Sci.*, 83: 8804-8807.
- ROBERTSON, M.J. (1986). Endothelium-dependent, calcium-induced relaxation of vascular smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 87, 506P.
- RUBANYI, G.M., SCHWARTZ, A., VANHOUTTE, P.M. (1985). The calcium agonists BAY K 8644 and (+)2002,791 stimulate the release of endothelial relaxing factor from canine femoral arteria. *Eur.J.Pharmacol.* 117, 143-144.
- SAGRADA, A., SCHIAVONE, A., CEFALA, A., MICHELETTI, R. (1989). Cimetropium bromide: in vitro and in vivo evaluation of spasmolytic activity on human and dog colon. *Digestion* 42, 143-150.

- SAIDA, K., VAN BREEMEN, C. (1989). Characteristics of the norepinephrine-sensitive Ca^{2+} store in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 21, 43-52.
- SANGUINETTI, M., JURKJEWICZ, N. (1990). Lanthanum blocks a specific component of I_K and screens membrane surface charge in cardiac cells. *Am.J.Physiol.* 259, H-1881-H1889.
- SCARPIGNATO, C., BIANCHI-PORRO, G. (1985). Cimetropium bromide, a new antispasmodic compound: pharmacology and therapeutic perspectives. *Int.J.Clin.Pharmacol.Res.* 5, 467-477.
- SCARPIGNATO, C., ALBANESE, V., MICALI, B. (1985). Effet d'un nouvel antispasmodique, le bromure de cimetropium, sur la secretion acide chez l'homme. *Gastroenterol.Clin.Biol.* 9(2 bis), 72A.
- SCARPIGNATO, C., DONETTI, A., IMBIMBO, B.P. (1988). Cimetropium bromide a new antimuscarinic compound endowed with antispasmodic activity. *Drugs of Today* 24, 859-876.
- SCHIAVONE, A., SCHIARI, G.B., CONTI de, L., MICHELETTI, R., SAGRADA, A., HAMMER, R., GIACHETTI, A. (1985). Cimetropium: characterization of antimuscarinic and spasmolytic properties. *Arzneimittelforschung* 35, 796-799.
- SCHIAVONE, A., VOLONTE, M., SAGRADA, A. (1989). Contraction of the colon induced by intraaortic injection of cholinergic agents: a procedure for estimating spasmolytic activity in the anaesthetized rat. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 301, 7-14.
- SCHMID, E., BLEICHERT, A., UBERLA, K., BITTER, FEHLHABER, E. (1968). Inhibition of small intestine motility by orally administered hyoscine-N-butyl bromide. *Arzneimittelforschung* 18(11), 1449-1463.
- SIEG, H. (1974). Double blind test using hyoscine-N-butyl bromide (Buscopan) to reduce pain in ulcer ventriculi? *Gastroenterol.* 12(4), 235-238.
- SIM, M.C., MAIJEET, S. (1989). Endothelial muscarinic receptors in rabbit aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 163, 399-400.
- SIMS, S.M., SINGER, J.J., WALSH, J.V.Jr. (1988). Antagonistic adrenergic-muscarinic receptor binding to isolated smooth muscle cells. *Science* 239, 190-193.

- SINGER, H.A., PEACH, M.J. (1982). Calcium and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 4(suppl II), II19-II25.
- SLISH, D.F., SCHULTZ, D., SCHWARTZ, A. (1992). Molecular biology of the calcium antagonist receptor. *Hypertension*, 19: 19-24.
- SPEEDING, M. (1987). Three types of Ca^{2+} channel explain discrepancies. *TIPS.*, 8: 115-117.
- SPEEDING, M., FRASER, S., CLARKE, B., PATMORE, L. (1990). Factors modifying the tissue selectivity of calcium-antagonists. *J. Neural Transm.*, 31: 5-16.
- SPEEDING, M. PAOLETTI, R., (1992). Classification of Calcium Channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol.Reviews.*, 44 (3) 363-376.
- SOLANKE, T.F., KUMAKURC, K., MARUYAMA, M., SOMEYA, N. (1969). Double-contrast method for the evaluation of gastric lesions. *Gut* 10(6), 436-442.
- SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P. (1968). Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 159, 129-145.
- SPIVACH, A., DARIS, G., VIBELLI, C. (1977). Efficacy of a new spasmolytic drug (DA-3177) on abdominal colia. Two double-blind controlled studies. *Gazz Med.Ital.* 136, 611-620.
- STANFIELD, P. (1986). Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *Br. Med. J.*, 42: 359-367.
- STAHL, W.L., SWANSON, P.D. (1972). Calcium movement in brain slices in low sodium or calcium media. *J.Neurochem.* 19, 2395-2407.
- STEGER, A.C., GALLAND, R.B., MURRAY, J.K., SPENCER, J. (1986). The use of hyoscine in upper gastrointestinal tract endoscopy. *Am.J.Gastroenterol.* 81, 615.
- STEPHENSON, J.A., SUMMERS, R.J. (1987). Autoradiographic analysis of receptors on endothelium. *Eur.J.Pharmacol.* 134, 35-43.
- STEPHENSON, J.A., GIBSON, R.E., SUMMER, R.J. (1988). An autoradiographic study of muscarinic cholinceptors in blood vessels: no localization on vascular endothelium. *Eur.J.Pharmacol.* 153, 271-283.

- STEINSLAND, O., FURCHGOTT, R., KIRPEKAR, S. (1973). Biphasic vasoconstriction of the rabbit ear artery. *Circ.Res.* 32, 49-58.
- STOCKHAUS, K., WICK, H. (1969). Studies of the toxicity of drugs in subcutaneous, intragastric and intraduodenal administration in rats. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* Julio 180(1), 155-161.
- STULL, J., BLUMENTHA, D.K., COOKE, R. (1980). Regulation of contraction by myosin phosphorylation. A comparison between smooth and skeletal muscle. *Biochem.Pharmac.* 29, 2537-2543.
- TAKAHASHI, M., SEAGAR, M.J., JONES, J.F., REBER, B.F., CATTERALL, W.A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 5478-5482.
- TAMARGO, J., ALEIXANDRE, A., RODRIGUEZ, S., GARCIA DE JALON, P.D. (1978). Effect of bunapthide on contractions induced by different agonists in the rat isolated aortae. *J.Pharm.-Pharmacol.* 30, 455-456.
- TAMARGO, J., TEJERINA, T. (1989). Effects of oxodipine on ⁴⁵Ca movements and contractile responses in vascular smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 97, 339-346.
- TAMARGO, J. (1992). Calcioantagonistas de segunda generación. Selectividad vascular. *Medicine (Supl. Junio)*: 43-49.
- TAYLOR, C.W. (1987). Receptor regulation of calcium entry. *Trends Pharmacol.Sci.* 8, 79-80.
- TEJERINA, T., SESIN, J., DELGADO, C., TAMARGO, J. (1988). Effect of milrinone on contractility and ⁴⁵Ca movements in the isolated rabbit aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 148, 239-246.
- TEJERINA, T., TAMARGO, J., (1992). Effects of oxodipine on rabbit aorta and mesenteric resistance vessels. *Eur.J-Pharmacol.* 219, 279-284.
- TIPS. (1993), Receptor Nomenclature Supplement
- TRIGGLE, D.J. (1982). Farmacología bioquímica de los bloqueadores del calcio. En: *Bloqueadores del Calcio*. Ed. S.I. Flaim y R. Zelis. pag. 37-51. Ene. Ediciones S.A. Madrid.
- TSIEN, R., TSIEN, R. (1990). Calcium channels, stores and oscillations. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 6: 715-760.

- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T., HORNE, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *TIPS.*, 12: 349-354.
- TSUKAHARA, T., HONGO, K., KASSEL, N.F., OGAWA, H. (1989a). Characterization of muscarinic cholinergic receptors on the endothelium and the smooth muscle of the rabbit thoracic aorta. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13, 870-878.
- TSUKAHARA, T., KASSELL, N.F., HONGO, K., VOLLMER, D.G., OGAWA, H. (1989b). Muscarinic cholinergic receptors on the endothelium of human cerebral arteries. *J.Cer.Blood Flow Metabol.* 9, 748-753.
- VAGHY, P.L., STRIESSNIG, J., MIWA, K., KNAUS, H.G., ITAGAKI, K., MCKENNA, E., GLOSSMANN, H., SCHWARTZ, A. (1987a). Identification of a novel 1,4-dihydropyridine and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *J. Biol. Chem.*, 262: 14337-14342.
- VAGHY, P.L., WILLIAMS, J.S., SCHWARTZ, A. (1987b). Receptor pharmacology of calcium entry blocking agents. *Am.J.Cardiol.* 59, 9A-17A.
- VAN BREEMEN, C., FARINAS, B.R., GERTA, P., McNAUGHTON, E.D. (1972). Excitation-contraction coupling in rabbit aortae studied by lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Cir.Res.* 30, 44-54.
- VAN BREEMEN, C. (1979). Blockade of membrane calcium fluxes by lanthanum in relation to vascular smooth muscle contractility. *Int.Arch.Physiol.Biochem.* 77, 710-717.
- VAN BREEMEN, C., AARONSON, P., CAUVIN, C.A., ZOUTZENHISER, R.D., MANGEL, A.W., SAIDA, K. (1982). El ciclo del calcio en el músculo liso arterial. En: *Bloqueadores del Calcio*. Ed. S.F. Flaim y R. Zelis. pag. 53-63. Ene Ediciones S.A. Madrid.
- VAN BREEMEN, C., CAUVIN, C., JOHNS, A., LEIFTEN, P., YAMAMOTO, H. (1986). Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle. *Fed.Proc.* 45, 2746-2751.
- VAN BREEMEN, C. (1986). Acción de los antagonistas del calcio en la fibra lisa vascular. En: *Simposium Internacional de Cardiopatía Isquémica*. Ed. V. Valle. pag. 15-31. Madrid.
- VAN BREEMEN, C., SAIDA, K. (1989). Cellular mechanism regulating $[Ca]_i$ smooth muscle. *Ann.Rev.Physiol.* 51, 315-329.

- VAN CHARLDORP, K.J., VAN ZWIETEN, P.A. (1989). Comparison of the muscarinic receptors in the coronary artery, cerebral artery and atrium of the pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 339, 403-408.
- VAN DE VOORDE, J., LEUSEN, J. (1983). Role of endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur.J.Pharmacol.* 87, 113-120.
- VANHOUTTE, P.M., SHEPHERD, J.T. (1973). Venous relaxation caused by acetylcholine acting on the sumpathetic nerves. *Circ.Res.* 32, 259-267.
- VANHOUTTE, P.M., SHEPHERD, J.T. (1983). Muscarinic and β -adrenergic prejunctional modulation of adrenergic neurotransmitters in the blood vessel wall. *Gen.Pharmacol.* 14, 35-37.
- VANHOUTTE, P.M., RUTANYI, G.M., MILLER, V.M., HOUSTON, D.S. (1986). Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann.Rev.Physiol.* 48, 307-320.
- VANHOUTTE, P.M. (1987). The end of the quest?. *Nature* 327, 459-460.
- VANHOUTTE, P.M. (1988). Vascular endothelium and Ca^{2+} antagonists. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 12(suppl 6), S21-S28.
- VAPAATALO, H., PENTTILA, A., KALTIALA, E. (1972). The absorption and elimination of orally administered (14C) hyoscine N-butylbromide (butylscopolamine). *J.Pharm.Parmacol.* 27(7), 542-543.
- VENEMA, V.J., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., HATHAWAY, G.M. ADAMS, M.E. (1992). Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins. *J.Biol.Chem.* 267(4). 2610-2615
- WALDMAN, S.A., MURAD, F. (1988). Biochemical mechanism underlying vascular smooth muscle relaxation: the Guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 12(suppl 5), S115-S118.
- WALDRAM, R., NUNNERLEY, H., DAVIS, M., LAWS, I.W., WILLIAMS, R. (1977). Detection and grading of oesophaged varices by fibre-optic endoscopy and barium swallow with and without Buscopan. *Clin.Radiol.* Mar 28(2), 137-141.
- WATSON, S. (1984). Subtypes of muscarinic receptors. Eds. Hirschowitz, B.Z., Hammer, R., Giachetti, A., Keirns, J. and Levine, R. *Trends Pharmacol.Sci.* sup. 1-103.

- WATSON, S., ABBOTT, A. (1992). Receptor Nomenclature Supplement. TIPS., April.
- WHAL, D. (1975). Resorptionsuerbesserung von Buscopan 12, Mitteilung (Interne Aktennotiz) v. 30, 4.
- WAHL, D. (1977). Halbwertzeiten von Parenteralem (i.v, intraduodenal) Buscopan am Menschen. Clinical Pharmacology (clinical report) 15, 7.
- WALDEK, F. (1969). The intestinal absorption of scopolamine N-butyl bromide (Buscopan) from isolated loops in conscious rats. Eur.J.Pharmacol. 8, 108.
- WATANABE, A.M. (1983). Cholinergic agonists and antagonists. En: Cardiac Therapy. Eds. Rosen M.R. y Hoffman, B.F. Martinus Nyhoff Pub., pp. 99-114.
- WESTON, A.H. (1989). Smooth muscle K⁺ channel openers; their pharmacology and clinical potential. Pflügers Arch. 414 (suppl 1) S99-S105.
- WILLIAMSON, J.R. (1986). Role of inositol lipid breakdown in the generation of intracellular signals. Hypertension 8(suppl II), II140-II156.
- WORLEY, J.F., DIETMER, J.W., NELSON, M.T. (1986). Single nisoldipine sensitive calcium channels in smooth muscle cells isolated from rabbit mesenteric artery. Proc.Natl.-Acad.Sci. USA 83, 5746-5750.
- WORLEY, J.F., STANDEN, N.B., NELSON, M.T. (1989). Transmitter regulation of single calcium channels and contraction of arteries. Biophys. J., 55: 304 (abstract).
- YAMAMOTO, H., VAN BREEMEN, C. (1986). Compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells. J.Gen.Physiol. 87, 369-389.
- YAMADA, S., YAMAZAWA, T., HARADA, Y., YAMAMURA, H.I., NAKAYAMA, K. (1988). Muscarinic receptor subtype in porcine coronary artery. Eur.J.Pharmacol. 150, 373-376.
- YAMANAKA, K., HASHIMOTO, S., MURAMATSU, I. (1986). Species difference in the muscarinic receptors of thoracic aorta. J.Pharmacol.Exp.Ther. 237(3), 980-986.
- ZWAAL, R.F.A., ROELOFSON, B., COLLEY, C.M. (1973). Localization of red cell membrane constituents. Biochim.Biophys. Acta 300, 159-182.