

VICTOR L. DEL VAL ARANDILLA

"DIHIDROPIRIDINAS. EFECTOS EN ILEON DE COBAYO Y SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE RATA".

Directora: Dra. M^a I. Martín Fontelles
Profesora Titular de Farmacología.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

AÑO 1991.

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Dña. M^a ISABEL MARTIN FONTELLES, PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

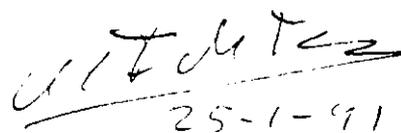
TIENE A BIEN INFORMAR

Que el Proyecto de trabajo presentado por el Doctorando D. VICTOR DEL VAL ARÁNDILLA, titulado: "Dihidropiridinas. Efectos el ileon de cobayo y sistema nervioso central de rata", realizado bajo su dirección y tutela, reúne los requisitos académicos y científicos necesarios para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 22 Enero, 1991.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: M.I. Martín

(fecha y firma)

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

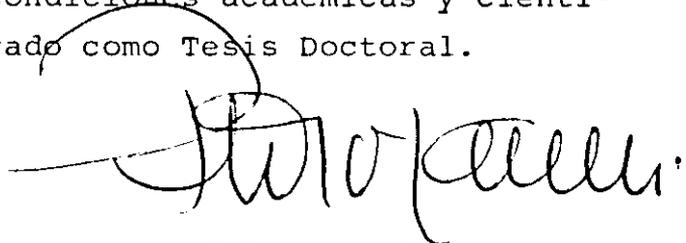
EL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA:

Favorablemente la presentación, exposición y defensa del Proyecto de trabajo presentado por D. VICTOR DEL VAL ARANDILLA y dirigido por la Dra. Martín Fontelles, Profesor Titular de este Departamento, dado que reúne las condiciones académicas y científicas requeridas para ser considerado como Tesis Doctoral.

25-1-91

Fecha reunión
Consejo Departamento



El Director del Departamento

25-1-91

Fdo.: P. Lorenzo

(fecha y firma)

A G R A D E C I M I E N T O S

Cuando uno acaba un trabajo experimental de la envergadura de una Tesis Doctoral y se pone a pensar quién ha tomado parte en su realización de una u otra forma, la verdad, es que la lista se hace interminable. Enumerarlos supondría correr el riesgo de ser injusto, ya que siempre se puede quedar alguien en el tintero. Por eso, quiero comenzar dando las gracias más sinceras a todos los que han colaborado en la elaboración de esta Tesis, desde los que me dejaron los "Rotring" para retocar las figuras hasta los que me prestaron su consejo técnico y/o personal.

Sin embargo, algunos de ellos, además vivieron este trabajo como suyo propio. Llegaron a formar parte de él y fueron su espíritu. Sin su colaboración habría sido IMPOSIBLE de todo punto, ya no la culminación, sino la iniciación del mismo.

Ellos también son coautores de esta Tesis Doctoral:

Prof.Dra. M.I. Martín Fontelles

Prof.Dra. M.I. Colado Megía

Prof.Dra. M.J. Alfaro Ramos

Sr.D. Fernando López Redondo

Sr.D. Carlos Goicoechea García.

También quiero agradecer al Prof.Dr. Pedro Lorenzo Fernández el haberme permitido realizar este trabajo de investigación en el Departamento que dirige y a la Universidad Complutense de Madrid por facilitarme el soporte económico necesario para la realización de la Tesis mediante la concesión de una Beca Predoctoral.

A todos ellos GRACIAS.

A mis Padres

A Irene

I N D I C E

I.- INTRODUCCION -----	1
I.1.- Papel del Ca ⁺⁺ en la contracción de la fibra muscular -----	2
I.1.1.- Origen del Ca ⁺⁺ utilizado en la contracción -----	5
I.2.- Mecanismos para incrementar la concentra- ción de Ca ⁺⁺ intracelular mediante la entrada de Ca ⁺⁺ -----	7
I.2.1.- Tipos de canales de Ca ⁺⁺ -----	9
I.2.2.- Farmacología de los canales de Ca ⁺⁺	14
I.2.3.- Papel del Ca ⁺⁺ intracelular -----	16
I.2.3.1.- Expulsión del Ca ⁺⁺ intra- celular -----	19
I.3.- Características de la preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mientérico de ileon de cobayo -----	22
I.4.- Estudio de la acción de Estímulo Eléctri- co, Acetilcolina, Cloruro de Potasio en la preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mien- térico de ileon de cobayo -----	24
I.4.1.- Contracción producida por Estímulo Eléctrico -----	25
I.4.2.- Contracción producida por Acetil- colina -----	29
I.4.3.- Contracción producida por Cloruro Potasio -----	40
I.5.- Fármacos antagonistas del calcio -----	47
I.5.1.- Definición -----	47

I.5.2.- Clasificación -----	50
I.5.3.- Estructura química -----	54
I.5.4.- Mecanismo de acción de las dihi- dropiridinas -----	57
I.5.4.1.- Punto de unión de las dihidropiridinas -----	57
I.5.4.2.- Interacciones entre los distintos tipos de anta- gonistas del Ca ⁺⁺ en el punto de unión de las di- hidropiridinas -----	64
I.5.4.3.- Correlación entre acopla- miento y actividad far- macológica -----	66
I.5.4.4.- Interacción con calmodu- lina -----	71
I.5.4.5.- Interacción con recepto- res alfa-adrenérgicos ---	71
I.5.4.6.- Otros lugares de inte- racción -----	73
I.5.5.- Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de las dihidro- piridinas -----	75
I.5.5.1.- Características farmaco- cinéticas -----	75
I.5.5.2.- Características farmaco- dinámicas -----	85
I.6.- Fármacos agonistas del Ca ⁺⁺ -----	89
I.6.1.- BAY K 8644 -----	90

I.6.1.1.- Estructura química -----	90
I.6.1.2.- Efectos del BAY K 8644 --	92
I.6.1.3.- Mecanismo de acción del BAY K 8644 -----	95
II.- OBJETIVOS -----	97
III.- MATERIAL Y METODOS -----	98
III.1.- Preparación de la solución KREBS -----	98
III.2.- Preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mientérico de ileon de cobayo -----	99
III.2.1.- Aislamiento de la prepara- ción Fibra Longitudinal-Ple- xo Mientérico -----	99
III.2.2.- Montaje de la preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mientérico -----	102
III.3.- Determinación de monoaminas en Sistema Nervioso Central de rata -----	103
III.3.1.- Aislamiento y extracción de las estructuras -----	103
III.3.2.- Manipulación de las estruc- turas del Sistema Nervioso Central de rata -----	105
III.4.- Fármacos utilizados -----	107
III.4.1.- Dilución de los fármacos ----	107
III.5.- Análisis estadístico de los resultados-	109
III.6.- Metodología general -----	109
III.6.1.- Preparación Fibra Longitudi- nal-Plexo Mientérico de ileon de cobayo -----	109

III.6.1.1.- Contracciones inducidas por estímulo eléctrico --	109
III.6.1.2.- Contracción provocada por Acetilcolina exógena --	110
III.6.1.3.- Contracción provocada por Cloruro de Potasio ---	111
III.6.1.4.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico -----	112
III.6.1.5.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por Acetilcolina-	113
III.6.1.6.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por Cloruro de Potasio -----	114
III.6.2.- Estructuras procedentes de Sistema Nervioso Central de rata -----	115

III.6.2.1.- Ratas control ---	115
III.6.2.2.- Ratas tratadas con dihidropiri- dinas -----	116
IV.- RESULTADOS -----	117
IV.1.- Experiencias realizadas en preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mientérico de ileon de cobayo -----	117
IV.1.1.- Efecto de las dihidropiridinas antagonistas del Ca ⁺⁺ y del BAY K 8644 sobre la contrac- ción inducida por estímulo eléctrico -----	117
IV.1.2.- Efecto de las dihidropiridinas del Ca ⁺⁺ y del BAY K 8644 sobre la contracción inducida por Acetilcolina -----	122
IV.1.3.- Efecto de las dihidropiridinas antagonistas del Ca ⁺⁺ y del BAY K 8644 sobre la contracción in- ducida por Cloruro de Potasio --	130
IV.2.- Efecto de las dihidropiridinas del Ca ⁺⁺ y del BAY K 8644 administradas "in vivo" en rata control -----	138
IV.2.1.- Efectos en el comportamiento de la rata -----	138
IV.2.2.- Efectos sobre los niveles de monoaminas -----	140
IV.2.2.1.- Mesencéfalo -----	140
IV.2.2.2.- Bulbo -----	142

IV.2.2.3.- Hipocampo -----	147
IV.2.2.4.- Corteza Cerebral ----	149
IV.2.2.5.- Médula Espinal -----	151
V.- RESUMEN DE LOS RESULTADOS -----	157
VI.- DISCUSION -----	161
VII.- CONCLUSIONES -----	180
VIII.- BIBLIOGRAFIA -----	181

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

El calcio (Ca^{++}) es un catión divalente involucrado en múltiples procesos celulares fundamentales (contractilidad, actividad secretora y actividad neuronal) en forma libre, o bien unido a macromoléculas como la calmodulina. Es activador en importantes procesos enzimáticos de la célula, y se le puede considerar como el mensajero intracelular final. Además no se puede olvidar el papel esencial que desempeña en la constitución de la matriz ósea.

El primero en observar la importancia del papel del Ca^{++} en la regulación de la actividad celular fue S. RINGER en 1883; aunque no se describió su funcionamiento intracelular hasta 70 años después por HEILBRUNN en Estados Unidos y por KAMADA en Japón (HEILBRUNN y WERCINSKI, 1947; KAMADA y KINOSITA, 1943).

Las investigaciones farmacológicas sobre el papel del Ca^{++} en el metabolismo celular comenzaron hace 20-25 años, durante los cuales, se ha avanzado considerablemente en su conocimiento como demuestran algunas revisiones realizadas en los últimos tiempos (EBASHI, 1980; GODFRAIND et al., 1986).

Desde finales de los años 60, sabemos que el papel del Ca^{++} en los procesos de excitación-contracción puede ser modificado por algunos agentes farmacológicos que no tienen efecto sobre las concentraciones de Ca^{++} extracelular ni sobre el Ca^{++} existente en tejidos calcificados (FLECKENSTEIN, 1968 y GODFRAIND y KABA, 1969). Posteriormente estos fármacos fueron denominados de maneras muy diferentes: "Bloqueantes de la entrada de calcio" (GODFRAIND, 1981), "Bloqueantes de los canales lentos de calcio" (NAYLER y POOLE-WILSON, 1981; BOU et al., 1983), aunque, tal vez, la denominación que más se ha universalizado ha sido la que propuso FLECKENSTEIN en 1977 utilizando los términos de "Antagonistas del calcio".

I.1.- PAPEL DEL Ca^{++} EN LA CONTRACCION DE LA FIBRA MUSCULAR

Los estudios sobre el papel del Ca^{++} en procesos farmacológicos se iniciaron trabajando sobre musculatura lisa (DURBIN y JENKINSON, 1961a,b; EVANS et al., 1958) y en ellos se demostró que la fuerza contráctil desarrollada por el útero de rata era directamente proporcional a la concentración de Ca^{++} extracelular (EDMAN y SCHILD, 1963).

Tanto en músculo esquelético como en músculo liso el proceso contráctil es activado por iones de Ca^{++} . Sin embargo, la fuente de estos es diferente según sea uno u otro tipo de músculo.

El músculo esquelético posee un retículo sarcoplásmico muy extenso y desarrollado y de él procede prácticamente el 100% del Ca^{++} necesario para la contracción.

Por el contrario, se puede admitir en general que, la musculatura lisa tiene un retículo sarcoplásmico menos desarrollado que la esquelética; de ahí, que la mayor parte de los iones de Ca^{++} empleados en su proceso contráctil, procedan del líquido extracelular (L.E.C.), y penetren en la célula en el momento de la contracción (GUYTON, 1987). Así estudios realizados por KATZ y MILEDI (1970) ponen de manifiesto, mediante técnicas de registro intracelular, que al disminuir la concentración de Ca^{++} extracelular, se obtiene un claro descenso de la amplitud del potencial de acción (P.A.) postsináptico provocado eléctricamente. Este efecto se revierte de forma prácticamente completa al incrementar los valores de Ca^{++} extracelular hasta los niveles iniciales del experimento.

VAN BREEMEN et al. (1980) explican la actividad contráctil del músculo liso como consecuencia de las variaciones de concentración del Ca^{++} intracitoplasmático. En reposo la concentración de Ca^{++} libre extracelular es, aproximadamente, de $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$; en este estado no existe corriente de Ca^{++} porque la permeabilidad de la membrana para este catión es muy baja. Cuando la diferencia entre las con-

centraciones de Ca^{++} intra/extracelular es mayor de 10^4 , se provoca un gradiente eléctrico de aproximadamente 60 mV, lo que produce un paso de Ca^{++} al interior de la célula. Los miofilamentos de músculo liso se activan con concentraciones de Ca^{++} intracitoplasmático que oscilan entre 10^{-7} y 10^{-5} M; además el 0,04% del Ca^{++} que se intercambia es sequestrado por el citoplasma celular.

La fibra muscular lisa, en contraste con la esquelética, posee unas dimensiones reducidas, por lo que los iones de Ca^{++} pueden difundir a todas las partes de la misma para desencadenar el proceso contráctil. El tiempo necesario para la difusión se denomina periodo latente y oscila normalmente entre 200 y 300 milésimas de segundo (GUYTON, 1987).

No obstante, en algunas fibras musculares lisas existe retículo sarcoplásmico moderadamente desarrollado aunque sin tubos T; en lugar de ellos las cisternas del retículo acaban en la membrana celular. Esto permite la liberación adicional de iones de Ca^{++} , lo que a su vez favorece la presentación de una mayor intensidad en la contracción que la que se produciría por la entrada del Ca^{++} exclusivamente a través de la membrana celular (GUYTON, 1987).

Se ha sugerido la posibilidad de que existan en el citoplasma celular, puntos de unión con alta afinidad

para el Ca^{++} , cuya activación podría estar mediada por receptores (DETH y VAN BREEMEN, 1977).

En resumen, la contracción muscular depende de la concentración de Ca^{++} intracelular libre, ya entre en el momento de la contracción (músculo liso) o se libere del retículo sarcoplásmico (músculo estriado).

La concentración de Ca^{++} intracelular en el músculo liso depende del buen funcionamiento de la membrana celular. Así:

- En la iniciación del proceso contráctil se permite la entrada masiva de Ca^{++} y, por tanto, existe una elevación de la concentración intracelular, aunque transitoria.

- Existen eficaces mecanismos transportadores de membrana que extraen el Ca^{++} continuamente del interior celular.

- En reposo, la membrana celular es prácticamente impermeable al Ca^{++} (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

I.1.1.- ORIGEN DEL Ca^{++} UTILIZADO EN LA CONTRACCION

Como ya se ha dicho anteriormente, el origen del Ca^{++} utilizado durante la contracción muscular es variable (VAN BREEMEN et al. 1980; ARTALEJO y GARCIA, 1986); en función del tipo de músculo (músculo esquelético: movilización de Ca^{++} extracelular; músculo liso visceral: utiliza ambas

fuentes de Ca^{++}), y del estímulo que provoque la contracción.

Abundando en este tema BOHR (1963) describió que el componente rápido de la contracción inducida por noradrenalina (NA) en músculo liso no vascular, era inversamente proporcional a la concentración de Ca^{++} extracelular, mientras que el componente lento era directamente proporcional; estudios posteriores sugirieron que la NA liberaba el Ca^{++} unido a estructuras intracelulares al principio, y posteriormente incrementaba la permeabilidad al Ca^{++} para mantener el componente lento de la contracción (DETH y VAN BREEMEN, 1977; HINKE, 1965; VAN BREEMEN, 1969).

Por otra parte, HINKE (1965) y HUDGINS y WEISS (1968) demostraron en diferentes trabajos que las contracciones producidas por potasio (K^+) dependían más del Ca^{++} extracelular que las provocadas por NA.

Así pues, tanto el tipo de estímulo, como el tipo de músculo estimulado son las variables de las que dependerá la procedencia del Ca^{++} utilizado en la contracción.

I.2.- MECANISMOS PARA INCREMENTAR LA CONCENTRACION DE Ca^{++}
INTRACELULAR MEDIANTE LA ENTRADA DE Ca^{++}

El Ca^{++} extracelular lo podemos encontrar libre, o bien unido a componentes específicos de la membrana celular (DETH y VAN BREEMEN, 1977). En la actualidad se especula con que éste último estuviera vinculado a ciertos receptores y fuera movilizado por estímulos específicos de la membrana (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

Los mecanismos de entrada de Ca^{++} extracelular al interior de la célula, se pueden resumir en:

- Liberación de Ca^{++} por Ca^{++} : Este mecanismo se da sobre todo en músculo liso y consiste en un trasiego inicial del Ca^{++} extracelular al interior celular que a su vez puede movilizar un depósito mayor de Ca^{++} intracelular, que sirve para mantener el proceso de acoplamiento excitación/contracción.
- Difusión Pasiva: Este mecanismo de entrada se basa en la existencia de un gradiente electroquímico favorable que permite el paso de Ca^{++} al interior celular a través de la membrana utilizando los canales de sodio (Na^+).
- Canales de Ca^{++} : Por analogía con el movimiento de otros cationes de pequeño tamaño, se considera que el movimiento

de Ca^{++} más importante desde el exterior al interior celular, tiene lugar a través de canales específicos, denominados "Canales de Ca^{++} " (FLOREZ et al., 1980).

Estos canales de Ca^{++} , se describen como poros en la membrana celular que tras diferentes estímulos permiten el paso de Ca^{++} al interior de la célula (HAGIWARA, 1973; REUTER, 1973; BAKER y GLITSCH, 1975).

Se identificaron por primera vez en músculo de animales invertebrados (crustáceos) (FATT y KATZ, 1953). En animales vertebrados la existencia de los canales de Ca^{++} fue descrita por primera vez en músculo de rana, en músculo de rata y en embrión de pollo (BIANCHI y SHANES, 1959), posteriormente se describió la existencia de estos canales en músculo liso vascular (HARDER y SPERELAKIS, 1979).

SANGUINETTI y KASS (1984) propusieron, por analogía con los canales de Na^+ que el canal de Ca^{++} puede encontrarse en tres estados diferentes:

- * Reposo (R): En este estado la conductancia del canal es mínima, porque la compuerta de activación está cerrada.
- * Activado (A): La activación se produce por el potencial de acción, y provoca un aumento breve de la permeabilidad del canal, por cierre rápido de las compuertas.
- * Inactivado (I): Este estado aparece inmediatamente después del estado activado, y se produce por el cierre de las compuertas de inactivación.

El canal, una vez inactivado, debe pasar al estado de repo so antes de ser activado de nuevo. A ésto se le denomina reactivación del canal (TAMARGO y VALENZUELA, 1987) (Fig. 1).

I.2.1. TIPOS DE CANALES DE Ca⁺⁺

El Ca⁺⁺ puede entrar en la célula a través de dos tipos de canales específicos (BOLTON, 1979):

- Canales de Ca⁺⁺ voltaje-dependientes (VOC).
- Canales de Ca⁺⁺ receptor-dependientes (ROC).

Canales de Ca⁺⁺ tipo VOC.

Como todo canal de Ca⁺⁺ éste está constituido por un poro delimitado por proteínas transmembrana insertadas en la bicapa lipídica (GODFRAIND et al. 1986). Este tipo de canal posee un sensor de voltaje (cuya misión es regular el estado del mismo), 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 (Fig. 2).

Los VOC no son exclusivos para el Ca⁺⁺; otros cationes tienen capacidad de atravesarlos, o de unirse a ellos (Ba⁺⁺, Na⁺, Sr⁺⁺, Mg⁺⁺) aunque

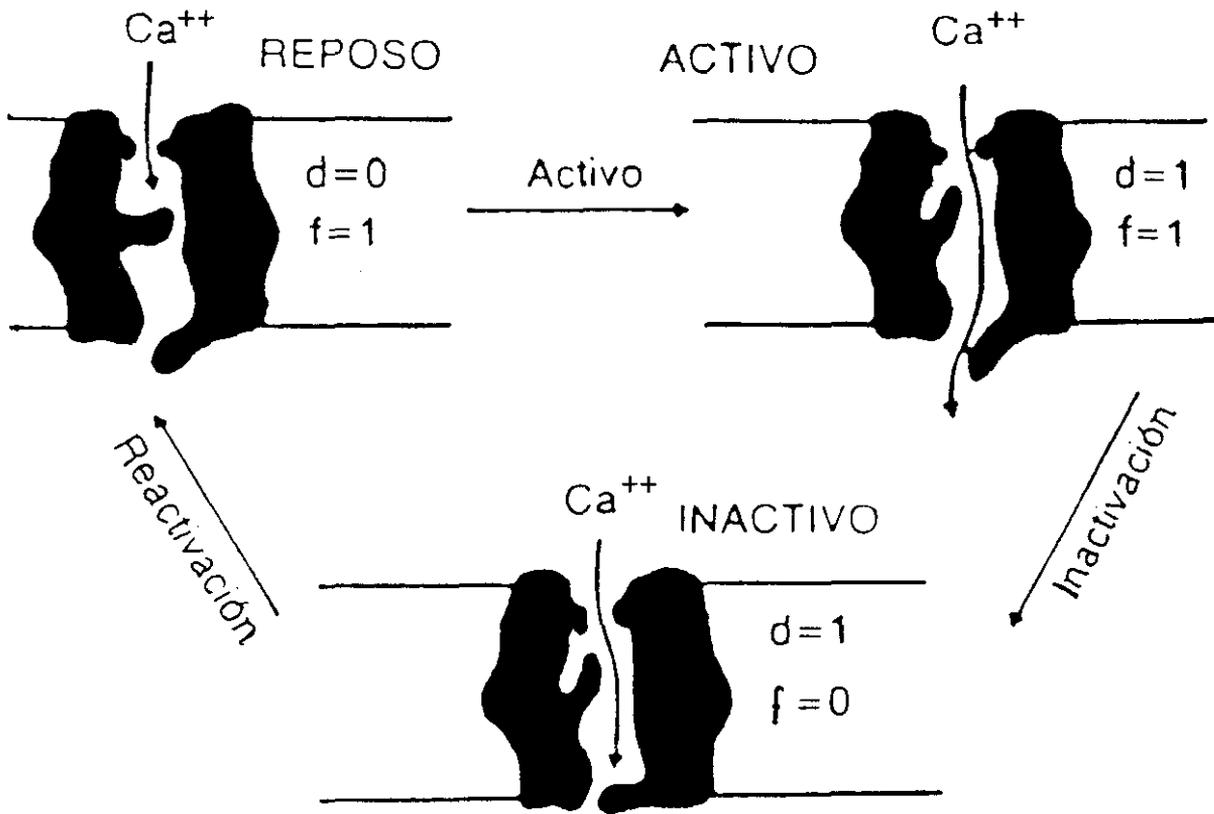


FIGURA 1

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 = cerrado; 1 = abierto. (Tomado de TAMARGO Y VALENZUELA, 1987).

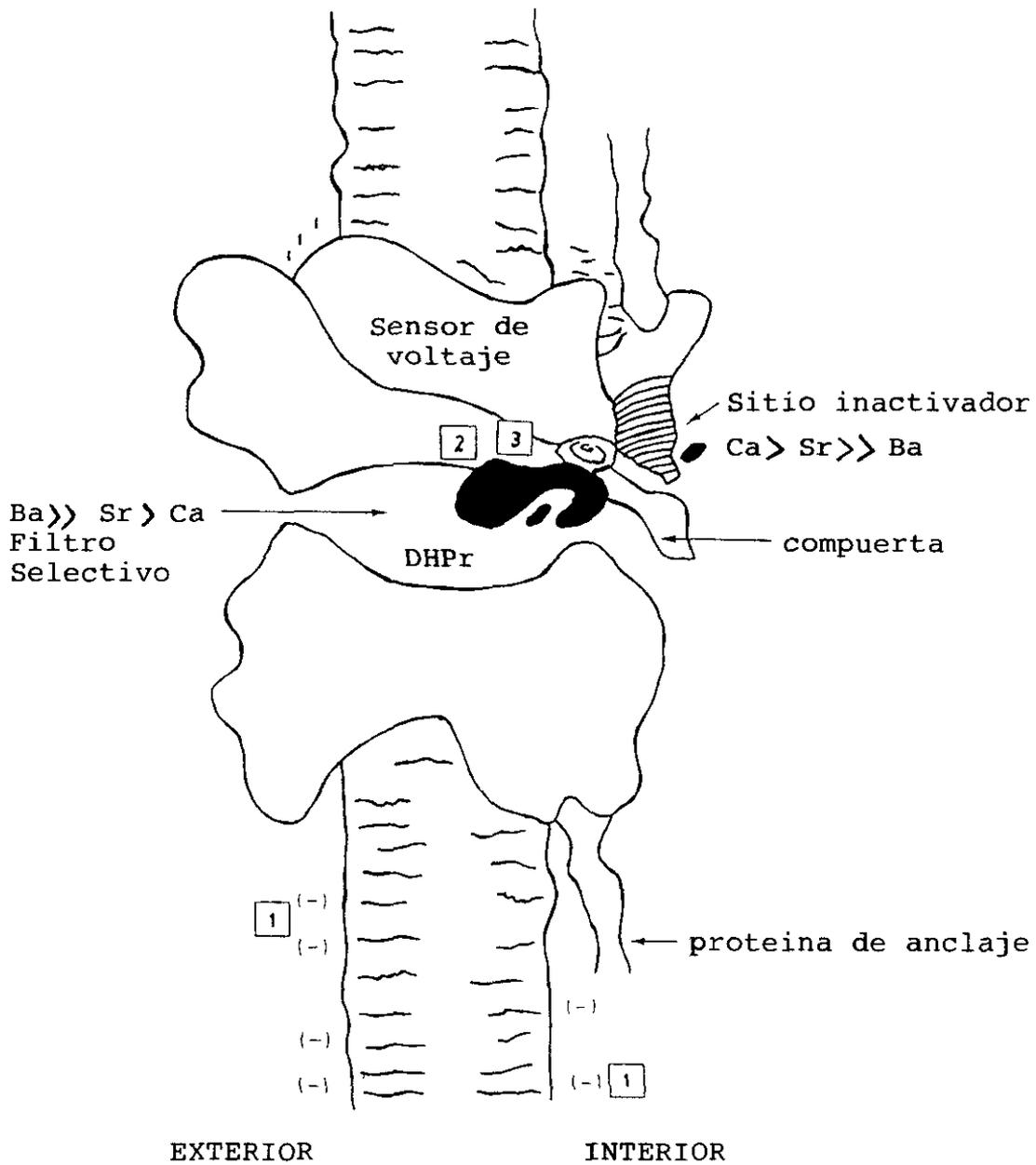


FIGURA 2

Representación esquemática de un canal de Ca^{++} tipo VOC. (1): cargas negativas en la superficie interna y externa de la membrana que sirven de sitio de unión a cationes divalentes. (2,3): lugares de fijación de antagonistas del Ca^{++} (Tomado de ARTALEJO y GARCIA, 1986).

existe un filtro selectivo para la entrada de cationes divalentes; siendo el orden de permeabilidad $Ba^{++} < Sr^{++} < Ca^{++}$. El lugar de unión de los cationes divalentes no permeables (Cd^{++} , Ba^{++}) se encuentra en la boca externa del canal y su unión impide la entrada de otros cationes (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

Se ha demostrado la existencia de diferentes tipos de canales VOC. Así HESS et al. (1984) y KOKUBUN y REUTER (1984) describieron los siguientes:

- Tipo 0.- Permanece cerrado y no presenta aperturas.
- Tipo 1.- Se caracteriza por permanecer cerrado la mayor parte del tiempo con presentación de aperturas de breve duración.
- Tipo 2.- Permanece abierto con presentación de cierres de breve duración.

Por otra parte NOWYCKY et al. (1985), NILIUS et al. (1985) y SIEKEVITZ et al. (1985) propugnaron este otro tipo de subdivisión de los VOC:

- Tipo T.- Se activa por depolarizaciones lentas y suaves y se inactivan rápidamente.
- Tipo N.- Para su activación requieren un potencial de membrana muy negativo y una gran depolarización en membrana presináptica. Se inactivan de manera relativamente rápida.

- Tipo L o Lentos.- Es el subtipo más abundante, se encuentra en casi todos los tipos celulares. Su activación se produce tras depolarizaciones sucedidas en el soma celular y conlleva la aparición de una corriente de Ca^{++} de larga duración.

Estos subtipos de canales VOC a parte de diferenciarse por el potencial que requieren para su activación también se pueden diferenciar por su sensibilidad farmacológica, de tal forma que sólo los de tipo L o Lentos se regulan por agonistas y antagonistas del Ca^{++} (NILIUS et al. 1985; NOWYCKY et al. 1985; HIRNING et al. 1988).

La inactivación de los VOC sucede por dos mecanismos:

- Depolarización
- Acumulación de Ca^{++} en el extremo citoplasmático del canal (ECKERT y CHAD, 1984; GREENBERG et al. 1985a).

Canales de Ca^{++} tipo ROC

De igual forma que en el caso de los VOC, este canal estaría constituido por un poro delimitado por proteínas transmembrana insertadas en la bicapa lipídica de la membrana celular; sin embargo, no está claro si el canal forma parte de la estructura de cada receptor o si existe un sólo tipo de canal que se activaría por varios receptores

acoplados al mismo (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

El concepto general sobre el funcionamiento de los canales de Ca^{++} tipo ROC es que la estimulación de un receptor, tras el acoplamiento de un ligando, provoca una respuesta que depende de la concentración de Ca^{++} extracelular y que consiste en activar el canal (GODFRAIND et al. 1986).

Por otra parte, diversos autores han descrito más de un neurotransmisor capaz de activar los canales tipo ROC; así por ejemplo y entre otros, se demuestra la existencia de unos canales activados por Serotonina (5-HT) y otros por Acetilcolina (Ach) en arteria coronaria bovina (RATZ y FLAIM 1985) y en aorta de conejo (FLAIM et al. 1985).

I.2.2.- FARMACOLOGIA DE LOS CANALES DE Ca^{++}

La distinción propuesta por BOLTON (1979) entre los tipos de canales de Ca^{++} (VOC y ROC) se basaba en estudios realizados en músculo liso. En éstos se observó, que algunos agonistas provocaban contracciones mantenidas en preparaciones depolarizadas con K^+ ; por otra parte, en preparaciones de músculo liso arterial estimuladas adrenérgicamente se provocaba contracción muscular sin variaciones en el potencial de membrana, pero con un incremento en el flujo

de entrada de Ca^{++} .

Además, investigaciones paralelas en aorta de conejo y en vasos mesentéricos, demostraron que las corrientes de Ca^{++} provocadas por NA y por depolarización inducida por K^+ , eran sinérgicas, selectivamente inhibidas por algunos antagonistas de Ca^{++} y reguladas de forma variable por el AMPc (VAN BREEMEN et al. 1980).

En estudios realizados por OSTERRIEDER et al. en 1982 se ponía de manifiesto que los VOC además de ser sensibles a los cambios ocurridos en el potencial de membrana durante la depolarización, también podían ser regulados por diversas sustancias como: AMPc y/o Proteinkinasa C (ambas mediante fosforilación de proteínas). Otros autores describieron que algunos neurotransmisores (5-HT, NA, Dopamina, Somatostatina, GABA) y PGE_1 podían producir una inactivación del canal de Ca^{++} tipo VOC (DUNLAP y FICHBACH, 1981; MacDONALD et al. 1986; MARCHETTI et al. 1986; MO et al. 1985). Esta inactivación se realizaría mediante la intervención de proteínas ligadoras de guanosa-trifosfatasa, también denominadas proteínas G (HOLZ et al. 1986).

Asimismo, también se describen sustancias capaces de modular la actividad de los ROC, tales como la Sustancia P y la Calcitonina (MURASE et al. 1986; NOHMI et al. 1986). Además los canales tipo ROC no presentan sensibilidad alguna

a las variaciones del potencial de membrana (MEYER, 1989).

Por último, algunas de las sustancias citadas anteriormente (AMPC, Proteinkinasa C) han sido descritas por otros autores como capaces de interactuar sobre ambos tipos de canales (VOC y ROC) (MEYER, 1989).

Resultados de experiencias realizadas en aorta de conejo demuestran que el BAY K 8644 (fármaco agonista de los canales de Ca^{++} perteneciente al grupo de las dihidropiridinas) abre selectivamente los VOC sin actuar sobre los ROC (YAMAMOTO et al. 1984). Estos hallazgos han servido de argumento a otros autores para diferenciar la sensibilidad de los VOC y los ROC a los fármacos antagonistas del Ca^{++} , y los mecanismos de entrada de Ca^{++} (GODFRAIND et al. 1986).

I.2.3.- PAPEL DEL Ca^{++} INTRACELULAR

Ya se ha descrito que, en general, la musculatura lisa posee un retículo sarcoplásmico menos desarrollado que el músculo esquelético y cardíaco, aunque es capaz de secuestrar Ca^{++} de manera eficaz mediante un mecanismo dependiente de ATP.

El papel que juega la mitocondria en la regulación de la homeostasis de Ca^{++} en condiciones normales, es muy poco importante, aunque puede actuar como un sistema de se-

cuestro auxiliar en determinadas situaciones patológicas en las que el Ca^{++} alcanza niveles intracelulares superiores a los normales, como en isquemia o hipoxia (GODFRAIND-DE BECKER y GODFRAIND, 1980).

En el caso de musculatura estriada (músculo cardíaco), el Ca^{++} libre citosólico está disponible para la reacción excitación/contracción o para ser tamponado en el retículo sarcoplásmico u otros organelos intracelulares.

La troponina y la tropomiosina son, en este tipo de músculo, las proteínas reguladoras más importantes; cuando el Ca^{++} se une a la troponina se produce un cambio conformacional en la tropomiosina, que favorece la activación de la ATPasa de la miosina por parte de la actina produciéndose seguidamente la contracción (BREMEL, 1974; BREMEL et al. 1977).

La ruptura de los enlaces químicos de ATP suministra la energía suficiente para el acortamiento muscular mediante el deslizamiento de los filamentos finos entre los gruesos (HARTSHORNE y SIEMANKOV, 1981). Posteriormente las fosfatasas se encargan del proceso de defosforilización, siendo estos enzimas un punto estratégico para la regulación del proceso contracción/relajación.

La terminación del proceso de contracción y la relajación están asociados con la disminución de la concentración de Ca^{++} citosólico.

La fase de contracción/relajación en el músculo liso vascular, depende, como en el músculo cardíaco, del incremento y caída de la concentración interna del Ca^{++} . La diferencia entre ambos tipos de músculo se encuentra en el mecanismo contráctil. Así, una vez que el Ca^{++} extracelular penetra en el interior de la célula, se une a una proteína reguladora intracelular: la Calmodulina, dando origen al compuesto Ca^{++} /Calmodulina, que activa a la quinasa de las cadenas ligeras de la miosina mediante fosforilación, lo que permite la actuación de la miosina-ATPasa y la contracción.

La relajación de la fibra muscular lisa es mediada de forma análoga a como se produce en el músculo cardíaco.

Existen otros factores que modifican la actividad de la Calmodulina en el músculo liso vascular (PFITZEER et al. 1984; LINCOLN, 1983):

- El AMPc: Puede inhibir el efecto de la calmodulina, provocando una relajación del músculo liso.

Por otra parte, la fosforilación dependiente de AMPc pro-

voca almacenamiento de Ca^{++} en el retículo sarcoplásmico (SAIDA y VAN BREEMEN, 1984).

- El GMPc: Defosforila las cadenas ligeras de miosina-quinasa favoreciendo la relajación. Se piensa que éste sería el mecanismo que explicaría la actividad vasodilatadora de los nitratos y del nitroprusiato (SUEMATSU et al. 1984b).

La capacidad del Ca^{++} para servir como mensajero intracelular depende de que el incremento de Ca^{++} citosólico libre sea reconocido como una señal para iniciar la función celular. La alta afinidad de la troponina C, calmodulina y miosina, por el Ca^{++} sirven para esta función.

Una vez consumada la unión Ca^{++} /proteína específica, el complejo formado activa la respuesta celular específica, ya sea contracción, en células musculares (estriadas o lisas), secreción y exocitosis en células ecrinas o conducción de impulsos en células nerviosas.

I.2.3.1. EXPULSION DEL Ca^{++} INTRACELULAR.

Existen dos mecanismos implicados en la extracción del Ca^{++} intracelular, que permiten el mantenimiento de sus niveles dentro de los límites fisiológicos (Fig. 3):

- Sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$:

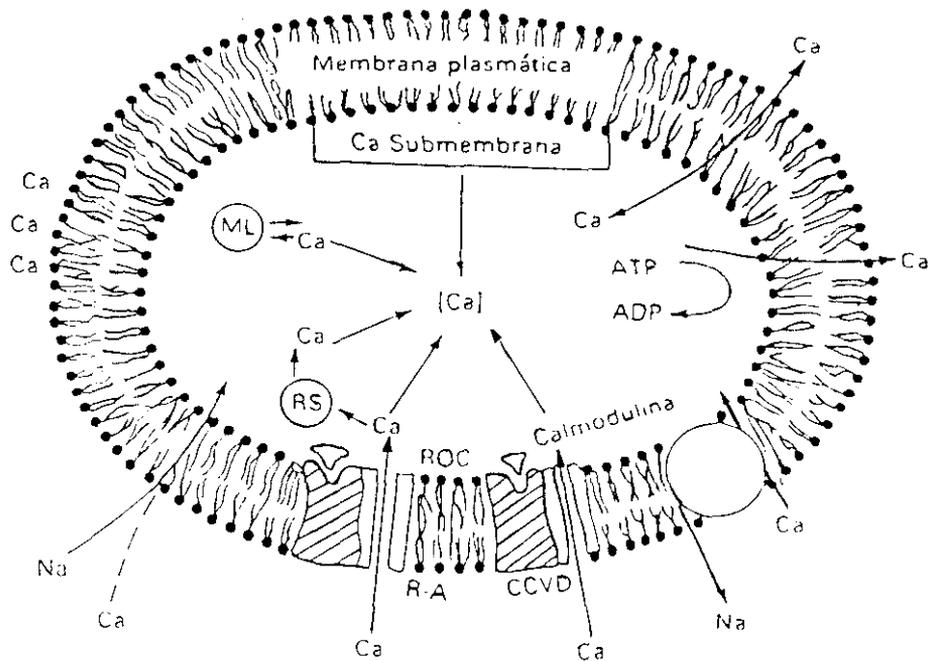


FIGURA 3

Representación de los mecanismos celulares que controlan los movimientos de Ca^{++} . (CCVD) Canales de Ca^{++} voltaje-dependientes. (ROC) Canal de Ca^{++} operado por receptor. (ML) Mitochondria. (RS) Retículo Sarcoplásmico. (Tomado de ARTALEJO y GARCIA, 1986).

El papel real que desempeña este sistema en la salida de Ca^{++} del interior celular es controvertido (BRADING y SNEDDON, 1980; HIRATA et al. 1981).

La salida de Ca^{++} se encuentra ligada a la entrada de Na^+ gracias a la existencia de un gradiente electroquímico favorable. El intercambio se produce en proporción 3/1 a favor del Na^+ . La eficacia de este sistema se encuentra ligada a la integridad de la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática; y se puede considerar que es menos eficaz que la bomba de Ca^{++} (MOREL y GODFRAIND 1982,1984).

- Bomba de Ca^{++} :

Es el sistema más importante de expulsión de Ca^{++} que tiene la célula (GODFRAIND et al. 1976). Consiste en el transporte de Ca^{++} mediado por una ATPasa dependiente de Ca^{++} y Mg^{++} . Extrae el Ca^{++} intracelular mediante un sistema dependiente de energía (ATP) pero electroneutro, intercambiándose 2 H^+ por 1 Ca^{++} (WIBO et al. 1980 WUYTACK et al. 1978).

Su actividad se ve estimulada por la existencia del complejo Ca^{++} /Calmodulina, por la proteinkinasa dependiente de AMPc y la proteinkinasa C (MOREL et al. 1981).

Así la elevación de Ca^{++} citosólico libre, además de activar las proteínas contráctiles, facilita la expulsión

de Ca^{++} a través de un proceso autocontrolable, que, junto con el sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, permite restaurar rápidamente los niveles de Ca^{++} intracelular (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

I.3. CARACTERISTICAS DE LA PREPARACION FIBRA LONGITUDINAL- PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

A principios de siglo, MAGNUS (1904) fué el primero en vislumbrar la posibilidad de separar las fibras longitudinales de las circulares en el ileon de conejo, y comprobó que junto a la musculatura longitudinal se arrastra la mayor parte del plexo de AUERBACH.

En la década de los 50, AMBACHE (1954), realizó observaciones similares. Además PATON (1955), observó la posibilidad de producir y registrar contracciones en segmentos de ileon de cobayo completo estimulado eléctricamente y posteriormente registró contracciones aplicando dos electrodos a las fibras longitudinales inervadas.

PATON en 1964 realizó estudios con microscopía electrónica en tiras longitudinales de ileon de cobayo, comprobando que era posible la separación completa entre tejido nervioso y músculo liso. El plexo de AUERBACH, junto con sus ramificaciones nerviosas, parece formar una lámina en

la superficie interna del músculo longitudinal y enviar fibras nerviosas que penetran en la capa muscular.

La Ach se ha descrito como el principal neurotransmisor que opera desde el plexo mientérico del ileon de cobayo a las células de la capa muscular longitudinal (PATON, 1957) y también en la neurotransmisión dentro del plexo (NISHI y NORTH, 1973).

En la preparación Fibra Longitudinal-Plexo Mientérico (FL-PM) de ileon de cobayo, se han caracterizado receptores alfa-adrenérgicos, localizados pre y postsinápticamente en las terminaciones nerviosas colinérgicas preganglionares y receptores beta-adrenérgicos situados postsinápticamente en las células de músculo liso. La activación de los receptores presinápticos produce una inhibición de la liberación de Ach, mientras que la estimulación de los beta-adrenoceptores, produce una inhibición directa de la contractilidad del músculo liso. Los alfa-adrenoceptores presinápticos presentes en los terminales nerviosos colinérgicos del ileon de cobayo son similares a los que se encuentran presinápticamente en las neuronas simpáticas (MALTA et al., 1981).

Además se sabe que las catecolaminas (adrenalina, isoprenalina y dopamina) actúan disminuyendo la amplitud de la contracción de la preparación FL-PM de ileon de cobayo

estimulada eléctricamente, probablemente por disminución de la liberación de Ach (KOSTERLITZ et al. 1970).

También se ha postulado que la 5-HT actúa como un modulador excitador en el plexo mientérico (SCHULZ y GOLDSTEIN, 1973).

Por otra parte, se ha observado que existe liberación de material endógeno opioide en la FL-PM de ileon de cobayo, que aumenta con la estimulación eléctrica. Esto ha sido descrito por PUIG et al. (1977) que observaron que utilizando la preparación FL-PM y estímulo eléctrico de alta frecuencia (10 Hz) se producía una inhibición de la respuesta contráctil y relacionaron este efecto con la liberación de péptidos endógenos opioides del plexo mientérico del ileon de cobayo (SCHULZ et al. 1977).

I.4. ESTUDIO DE LA ACCION DE ESTIMULO ELECTRICO, ACETILCOLINA, CLORURO DE POTASIO EN LA PREPARACION FIBRA-LONGITUDINAL- PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

La preparación FL-PM de ileon de cobayo ha sido ampliamente utilizada para el estudio del mecanismo de acción de diferentes fármacos y sustancias, así como para averiguar sus características intrínsecas de inervación y su capacidad para liberar sustancias neurotransmisoras (PATON et al. 1971; GOODMAN y WEISS, 1971; BOLTON, 1979; HURWITZ

et al. 1980; SHINOZUKA et al. 1985; GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987; ALBERTS y OGREN, 1988; MILANES et al. 1989).

I.4.1.- CONTRACCION PRODUCIDA POR ESTIMULO ELECTRICO.

Ya en 1968, PATON y ZAR describieron que las preparaciones FL-PM de ileon de cobayo denervadas, no presentaban respuesta contráctil al estímulo eléctrico (E.E.), además no se encontraba Ach detectable, ni se liberaba espontáneamente, ni tras E.E..

Por el contrario, estos mismos investigadores observaron que las preparaciones FL-PM de ileon de cobayo innervadas, tenían un notable contenido de Ach, que liberaban espontáneamente y además presentaban respuesta contráctil al E.E.; de esta forma concluyeron que la preparación FL-PM de ileon de cobayo denervada no libera cantidades significativas de Ach, ya que, al menos el 95% de la Ach liberada, sino el total de la misma, proviene del tejido nervioso. Previos a estos experimentos de PATON y ZAR, otros investigadores habían tratado de averiguar el origen de la Ach liberada por la preparación FL-PM de ileon de cobayo (DIKSHIT, 1938; FELDBERG y LIN, 1949,1950; JOHNSON, 1963) aunque en ningún caso pudieron descartar un origen muscular directo.

Se sabe que la cantidad de Ach en la terminación

nerviosa colinérgica se mantiene constante aunque incrementemos la liberación de Ach (BIRKS y MacINTOSH, 1961), que el incremento de liberación de Ach provoca un incremento de su síntesis (PATON et al. 1971), y que el E.E. provoca un aumento de liberación de Ach (PATON et al. 1971; KILBINGER y NAFZINGER, 1985; SHINOZUKA et al. 1985).

En reposo el contenido de Ach no varía significativamente; cuando se estimula eléctricamente la preparación (10 Hz), se produce un aumento de la síntesis (PATON et al. 1971); si el estímulo es de baja frecuencia (0,1 Hz) no se produce liberación de Ach (SHINOZUKA et al. 1985), tal vez porque los estímulos de baja frecuencia no llegan a activar a las terminaciones nerviosas presinápticas (IKUSHIMA et al. 1981). Por el contrario, estímulos con frecuencias por encima de 10 Hz no provocaron una mayor liberación de Ach, lo que sugiere que con un estímulo de 10 Hz de frecuencia se consigue el máximo de síntesis (PATON et al. 1971).

La liberación de Ach depende de la concentración de Na^+ intracelular en la terminación nerviosa (BIRKS, 1963) de tal forma que una disminución en dicha concentración provoca un incremento en la liberación de Ach (PATON et al. 1971). Tras esta consideración los mismos autores sugirieron que la liberación de Ach debía depender de la inactivación de una enzima, la $(\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{++})$ -ATPasa en la membrana axo-

nal. Esta había demostrado estar presente en la membrana de tejidos nerviosos (SKOU, 1957; BONTING et al. 1962; SOMOGYI, 1964), así como en eritrocito y membrana de músculo cardíaco (DUNHAM y GLYNN, 1961; REPKE, 1965).

Estudios más recientes demuestran que los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), los activadores de la adenilato ciclase (Foskolina) y los inhibidores de la fosfodiesterasa (3-isobutil-1-metilxantina) (IBMX) varían la liberación de Ach de forma concentración-dependiente (ALBERTS y ÖGREN, 1988). Así la liberación de Ach provocada por E.E. en la preparación FL-PM de ileon de cobayo se ve incrementada por el aumento de AMPc (ALBERTS y STJÄRNE, 1982) de manera concentración-dependiente, y disminuida por dosis elevadas de GMPc (ALBERS y ÖGREN, 1988). Tanto la foskolina como el IBMX incrementaron la liberación de Ach (ALBERTS y ÖGREN, 1988).

Por otra parte la adenosina inhibe la respuesta contráctil provocada por E.E. en ileon de cobayo, y esto se produce por una disminución en la liberación de Ach desde las terminaciones nerviosas colinérgicas intramurales (HAYASHI et al. 1978, 1985). Esta acción inhibidora de la adenosina parece estar íntimamente relacionada con los movimientos de Ca^{++} extracelular, hasta el punto de que, el incremento de la concentración de Ca^{++} extracelular, inhibe de manera competitiva la acción de la adenosina (HAYASHI et al. 1981).

SHINOZUKA et al. (1985) han descrito que la adenosina abole totalmente la liberación de Ach y la recaptación de Ca^{++} provocada por E.E. en la preparación FL-PM de ileon de cobayo, lo que les ha llevado a concluir que la adenosina inhibe la liberación de Ach por provocar una inhibición del flujo de entrada de Ca^{++} durante la depolarización de las terminales nerviosas presinápticas en ileon de cobayo.

Se puede resumir, por tanto, que:

- La contracción provocada por E.E. en la preparación FL-PM de ileon de cobayo se debe a que el E.E. origina la liberación de Ach desde las terminaciones nerviosas colinérgicas; esta liberación se encuentra regulada por los receptores muscarínicos presinápticos.

- La Ach liberada actúa sobre receptores muscarínicos postsinápticos (LLINAS, 1982) en manera similar a como lo hace la Ach exógena (se tratará en el siguiente apartado).

- La activación de los receptores muscarínicos postsinápticos para Ach afecta a los niveles de AMPc y GMPc, y se ha relacionado con un movimiento de los iones de Ca^{++} , aunque el mecanismo de acción de los receptores presinápticos no está aún bien aclarado (ALBERTS y ÖGREN, 1988).

I.4.2.- CONTRACCION PRODUCIDA POR ACETILCOLINA.

La Ach es un agonista de receptores muscarínicos, cuyo estímulo provoca generalmente contracción o aumento de la frecuencia y/o de la fuerza contráctil del músculo liso.

Existen algunos tipos de músculo liso sobre los que la acción de la Ach no sólo no produce contracción o aumento del tono, sino todo lo contrario, tiene un efecto inhibitor o relajante; así, por ejemplo, la acción de la Ach sobre su receptor muscarínico es relajante en músculo liso vascular (HERMAN et al. 1971; KURIYAMA y SUZUKI, 1978; VAN HOUTTE, 1977) aunque, es posible que la inhibición del tono simpático refuerce este mecanismo (VAN HOUTTE et al. 1975) y sobre músculo cardíaco y otros (COLLIER et al. 1972; GILLESPIE y McGRATH, 1974; CREED y GILLESPIE, 1976; CREED et al. 1977).

La Ach al actuar sobre receptores muscarínicos en musculatura intestinal lisa provoca contracción (BOLTON, 1979). Los receptores muscarínicos se encuentran localizados en la membrana de las células musculares lisas y el efecto que se observa se produce por estimulación directa de estos receptores (PATON y ZAR, 1968).

La Ach parece unirse, al menos a dos tipos de lugares diferentes (YOUNG, 1974; TAYLOR et al. 1975; WARD

y YOUNG, 1977) con la misma afinidad en el ileon de cobayo.

El descubrimiento de sustancias anticolinérgicas (Pirenzepina) que tienen selectividad para determinados tejidos y órganos ha permitido clasificar los receptores muscarínicos en base a la sensibilidad del receptor a la Pirenzepina (BROWN et al. 1980; BIRDSALL y HULME, 1983), de tal forma que al receptor ganglionar postsináptico con alta afinidad a Pirenzepina se le denominó M_1 , y al receptor postganglionar postsináptico y con baja afinidad a Pirenzepina M_2 . Se ha descrito un tercer tipo de receptor muscarínico (M_3) con sensibilidad intermedia a Pirenzepina localizado en glándulas exocrinas (DOODS et al. 1987).

Por otra parte KILBINGER y NAFZINGER (1985) describen la existencia de varios tipos de receptores muscarínicos en ileon de cobayo:

- Un receptor muscarínico postsináptico postganglionar que media la contracción del músculo liso.
- Un receptor inhibitor de la liberación de Ach inducida tras la estimulación de los nervios mientéricos, que se supone localizado presinápticamente en el ganglio mientérico (MORITA et al. 1982b) y en la terminación nerviosa postganglionar que inerva a la fibra longitudinal, localizado presinápticamente (KILBINGER, 1984).
- Un tercer tipo de receptor muscarínico se ha descrito en el cuerpo de las células del ganglio mientérico, cuya estimulación provocaría depolarizaciones lentas de la membrana celular (MORITA et al. 1982a).

La respuesta de la membrana celular de las células musculares lisas tras la estimulación colinérgica tiene un apreciable tiempo de latencia, que es de, aproximadamente, 100 mseg. (OHASHI y OHGA, 1967, ITO y KURIYAMA, 1971) y aunque es independiente de las terminaciones nerviosas, parece estar relacionado con estructuras situadas en la vecindad del receptor postsináptico (BOLTON, 1976; HILL-SMITH y PURVES, 1978).

Este periodo de latencia parece ser una característica de las respuestas mediadas por receptores muscarínicos en diferentes tipos celulares como músculo cardíaco (PURVES, 1976), tejido glandular (NISHIYAMA y PETERSEN, 1975), células ganglionares (KOKETSU et al. 1968) y músculo liso (HILL-SMITH y PURVES, 1978). Existen excepciones en cuanto a la aparición del tiempo de latencia, sobre todo cuando se estimula la fibra muscular con un campo eléctrico, aunque es posible que se explique por la existencia de una estimulación muscular directa (ITO y KURIYAMA, 1973).

Mientras la Ach permanece unida a su receptor postsináptico se produce un aumento de la conductancia total de la membrana celular, cuando esto sucede en el ileon de cobayo, los potenciales de acción que se producen, o están aumentados de tamaño o aparecen en forma de una onda lenta (KURIYAMA et al. 1967; HUKUHARA y FUKUDA, 1968; BOLTON, 1972).

El incremento de la conductancia total de la membrana va a producir alteraciones en el trasiego normal de diferentes cationes a través de la misma. Así se observan variaciones en los movimientos de:

- Sodio: La estimulación del receptor muscarínico postsináptico por Ach provoca una depolarización del músculo liso y un incremento de la entrada de Na^+ a través de los canales de Na^+ regulados por el receptor de Ach. Al disminuir la concentración de Na^+ extracelular disminuye también el paso de Na^+ y la depolarización de membrana (BOLTON 1973a; SZURSZEWSKI, 1973).

Esto sucede lo mismo en músculos polarizados que en músculo depolarizados previamente por K^+ (JOINER, 1973; HAMON y WORCEL, 1974; WORCEL y HAMON, 1976), lo que sugiere que el estímulo del receptor postsináptico permite el paso de Na^+ a través del canal en un solo sentido, hacia dentro.

- Potasio: El estímulo del receptor colinérgico postsináptico por Ach produce una gran salida de K^+ en músculo liso (LEMBECK y STROBACH, 1956; HURWITZ, 1960; HODGSON y DANIEL, 1972).

Este efecto no se modifica significativamente al variar las concentraciones extracelulares de Ca^{++} y Mg^{++} , aunque sí disminuye considerablemente en medio libre de Ca^{++}

y en preparaciones depolarizadas previamente con K^+ (BURGEN y SPERO, 1968,1970).

Al depolarizar el músculo previamente al estímulo con Ach, se produce un incremento en la entrada de K^+ (HAMON y WORCEL, 1974; WORCEL y HAMON 1976). El efecto inverso se observa si el músculo se encuentra previamente polarizado (BANARJEE, 1972; JOINER, 1973).

Esto sugiere que el K^+ se mueve a través de los canales de K^+ regulados por Ach en ambas direcciones.

- Cloro: El estímulo del receptor colinérgico post sináptico por Ach provoca un incremento de los movimientos de Cl^- en ambos sentidos en músculo liso intestinal (DURBIN y JENKINSON, 1961a), aunque en músculo liso uterino sólo está incrementada la salida (HAMON y WORCEL, 1974; WORCEL y HAMON, 1976).

La depolarización de membrana producida por la Ach no se ve alterada por las variaciones en la concentración de Cl^- extracelular (BOLTON, 1973b; BÜLBRING y SZURSZEWski, 1974).

- Calcio:

- Extracelular: El estudio de los movimientos de Ca^{++} extracelular tras el estímulo colinérgico con Ach

ha dado resultados contrapuestos. Así se ha observado que la estimulación de receptores muscarínicos en músculo liso depolarizado originaba un incremento en la entrada de Ca^{++} (BANARJEE, 1972; NASU y URAKAWA, 1973; LAMMEL, 1977). Lo mismo habían encontrado en músculo liso depolarizado con K^+ ROBERTSON (1960) y DURBIN y JENKINSON (1961b). Trabajos posteriores han verificado estos resultados y han apuntado que la Ach favorece la entrada de Ca^{++} al interior celular porque abre los canales de Ca^{++} tipo VOC (BOLTON, 1979; MITCHELSON y ZIEGLER, 1984; GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987).

Aunque otros autores no hayan obtenido los mismos resultados (SCHATZMAN, 1961,1964; VAN BREEMEN y DANIEL, 1966; SUGI y TAMEYASU, 1975) parece claro que el estímulo colinérgico con Ach provoca el paso de Ca^{++} al interior celular, muy probablemente a través de los VOC.

- Intracelular: La activación de los receptores muscarínicos postsinápticos con Ach produce la liberación del Ca^{++} que se encuentra unido a estructuras intracelulares, no siendo emulada esta acción por soluciones hiperpotásicas (BOLTON, 1979). Ya en estudios anteriores SUGI y DAIMON (1977), trabajando con tenia coli de cobayo y exponiendo la preparación a Ach 10^{-5} M observaron que se producía una liberación del Ca^{++} unido a la cara interna de la membrana celular por todo el citoplasma. Más modernamente se ha descrito que el inositol trifosfato tiene acceso a estos

depósitos intracelulares de Ca^{++} y es capaz de movilizarlo (STREB et al. 1983; HIRATA et al. 1984; SUEMATSU et al. 1984a); asimismo se sabe que la Ach produce alteraciones en la hidrólisis de inositol trifosfato que, actuando como segundo mensajero, libera al Ca^{++} de los depósitos intracelulares (BERRIDGE y IRVINE, 1984).

Se puede concluir por tanto, que el estímulo colinérgico mediado por Ach provoca, por una parte, un incremento del flujo de Ca^{++} hacia el interior celular a través de los VOC, y por otra, una liberación de Ca^{++} intracelular que se encuentra unido a diferentes organelos intracitoplasmáticos.

El estímulo provocado por la Ach también provoca alteraciones en los niveles de nucleótidos cíclicos; de esta forma al estimular receptores muscarínicos postsinápticos en diferentes tipos de músculo liso se provoca un aumento en los niveles de GMPc (ANDERSSON et al. 1975; DIAMOND y BLISARD, 1976; RICHELSON y EL-FAKAHANY, 1981; DASCAL et al. 1984); aunque este efecto no es exclusivo del estímulo por Ach, ya que se sabe que otras sustancias como la histamina (ANDERSSON et al. 1975), NA (SCHULTZ et al. 1973), 5-HT (CLYMAN et al. 1975) o soluciones hiperpotásicas (ANDERSSON y DJÄRV, 1978) también lo pueden producir.

Para explicar esta acción se ha sugerido que el incremento de los niveles de Ca^{++} intracelular provocado por la Ach originaría a su vez un incremento en los niveles de GMPc (ANDERSSON et al. 1975; ANDERSSON y DJÄRV, 1978), mientras que otros opinan que el estímulo provocado por Ach origina directamente un incremento de los niveles de GMPc que a su vez produce un incremento del flujo de Ca^{++} hacia el interior celular (SCHULTZ et al. 1973; RICHELSON y EL-FAKAHANY, 1981).

Por otra parte, se han obtenido resultados en los que se observa que el GMPc actúa como segundo mensajero en la respuesta muscarínica (BEAM y GREENGARD, 1976; GREENGARD, 1978; DASCAL et al. 1984).

Lo que sí parece claro, es que el incremento de los niveles de GMPc provocado por la Ach no se produce en todos los tipos de músculo liso, observándose en conducto deferente de rata, miometrio de cobayo y tenia coli de cobayo (SCHULTZ et al. 1973; DIAMOND y HARTLE, 1976; DIAMOND, 1977), mientras que en útero de rata e ileon de cobayo no se aprecia (DIAMOND y HARTLE, 1976).

Como se citó al principio de este punto, el estímulo de receptores muscarínicos provoca, generalmente, una respuesta contráctil. Esta respuesta es bifásica (Fig. 4),

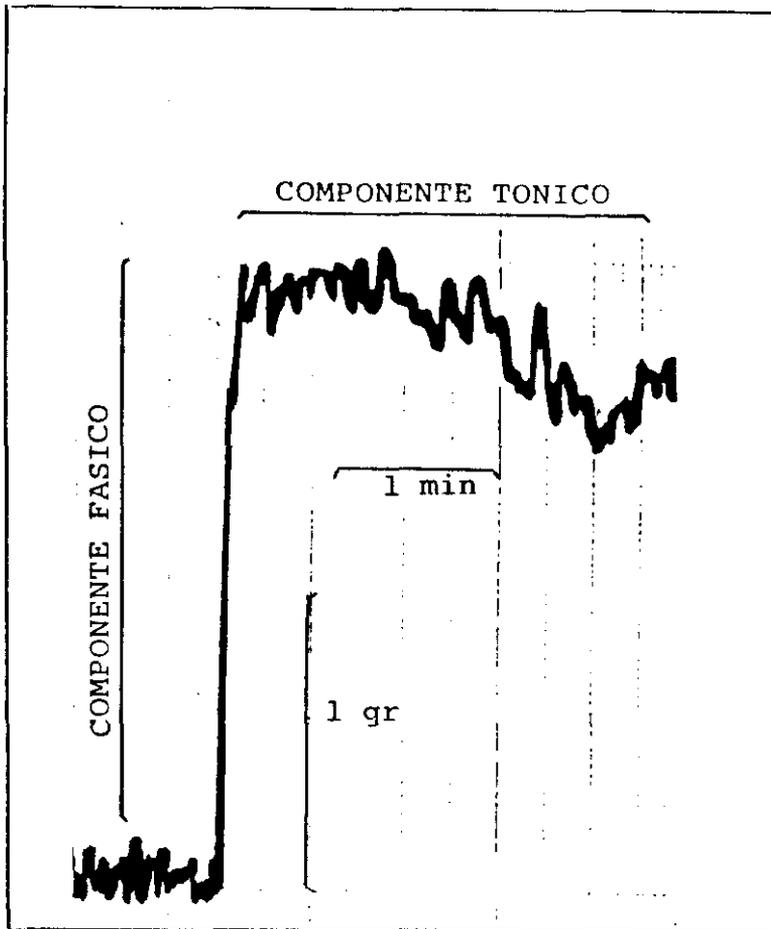


FIGURA 4

Respuesta contráctil de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobayo inducida por Acetilcolina. Obsérvense los dos componentes de la contracción (fásico y tónico).

y consiste en un componente inicial rápido (fásico) seguido de una relajación parcial y un componente lento (tónico) (TICKU y TRIGGLE, 1976; TRIGGLE y TRIGGLE, 1976; ROSEMBERGER et al. 1979; MITCHELSON y ZIEGLER, 1984).

La respuesta contráctil provocada por Ach es muy similar a la provocada por K^+ , aunque ambas pueden diferenciarse por el tiempo que tardan en desarrollarse (tiempo de latencia muscarínico), siendo la respuesta al K^+ (tanto el componente fásico como el tónico) más rápida, más inmediata en su aparición; (TRIGGLE y TRIGGLE, 1976), aunque no existen diferencias significativas en el tiempo de recuperación desde la fase tónica hasta el equilibrio.

Como ya se ha comentado ampliamente en este apartado, la contracción muscular provocada por Ach tiene lugar porque ésta favorece la entrada de Ca^{++} desde el exterior celular a través de los VOC y además moviliza Ca^{++} de los depósitos intracelulares. Se ha sugerido que el componente fásico de la respuesta contráctil provocada por Ach está relacionada fundamentalmente con la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares (sobre todo de los unidos a la cara interna de la membrana) y que el componente tónico lo está con un incremento de la entrada de Ca^{++} a través de la membrana (VOC) (CHANG y TRIGGLE, 1973; TRIGGLE y TRIGGLE, 1976; DANIEL et al. 1979).

Esto podría explicar por qué Gallopamil y Nifedipino (fármacos antagonistas del Ca^{++}) tienen un efecto inhibitor sobre el componente tónico de la respuesta contráctil producida por Ach, y tienen mucho menos efecto inhibitorio sobre la respuesta fásica (MITCHELSON y ZIEGLER, 1984).

Así, se puede resumir por tanto que:

- El estímulo del receptor muscarínico por la Ach provoca, generalmente, una respuesta contráctil.

- Existen dos tipos de receptores muscarínicos, unos excitatorios (postsinápticos) y otros inhibitorios (pre_{sinápticos}) y la Ach exógena actúa sobre los postsinápticos (excepto si están bloqueados).

- La aparición de la respuesta muscarínica sufre un tiempo de latencia característico.

- La depolarización provocada por la Ach origina alteraciones en los movimientos transmembrana, sobre todo, de los cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) y del Cl^- así como incremento en los niveles de GMPc.

- La respuesta contráctil provocada por Ach es bifásica y se produce por una liberación del Ca^{++} unido a estructuras intracelulares y por un aumento del paso del Ca^{++} extracelular a través de los VOC.

- Los fármacos antagonistas del Ca^{++} (Gallopamil y Nifedipino) inhiben selectivamente el componente lento (tónico) de la contracción inducida por Ach siendo considerada

blemente menos eficaces sobre el componente rápido (fásico).

I.4.3.- CONTRACCION PRODUCIDA POR CLORURO DE POTASIO.

Se ha estudiado la respuesta contráctil producida por soluciones hiperpotásicas en diferentes preparaciones de músculo liso: Tenia de cobayo (IMAI y TAKEDA, 1967; ITO y KURIYAMA, 1974; GABELA, 1978), músculo intestinal (CHENG, 1976), estómago de rata (SHINO, 1976), miometrio (OSA, 1973; OSA y KURIYAMA, 1975), musculatura circular del estómago del cobayo (KURIYAMA et al. 1975,1976) y músculo liso vascular (LAWSON y CAVERO, 1989).

Estas soluciones provocan en el músculo liso contracciones que muestran un pico inicial que decae de manera lenta hasta volver a un estado estable a un nivel más bajo (Fig. 5); al pico, se le denomina componente fásico de la contracción y al segundo componente más lento y mantenido, componente tónico (IMAI y TAKEDA, 1967; SYSON y HUDDART, 1973; TRIGGLE y TRIGGLE, 1976; BOLTON, 1979). Algunas veces existe una pequeña inflexión que separa el componente fásico del tónico (BEVAN y WATERSON, 1971; BEVAN et al. 1973).

El tamaño de ambos componentes de la contracción es variable y, entre otros factores, depende de la concentración de K^+ aplicada (BOLTON, 1979).

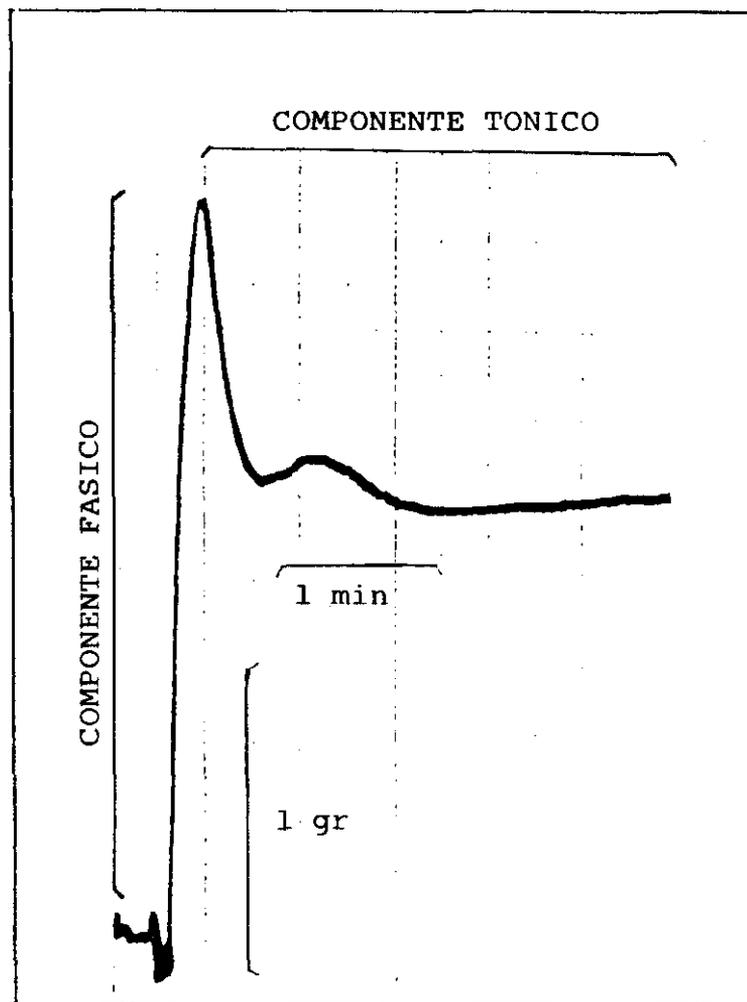


FIGURA 5

Respuesta contráctil de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobayo inducida por Cloruro de Potasio. Obsérvense los dos componentes de la contracción (fásico y tónico).

El componente fásico de la contracción provocada por ClK parece estar relacionado con la capacidad de producir potenciales de acción (P.A.) por parte del músculo liso estudiado (ITO y KURIYAMA, 1974); sin embargo, este mismo tipo de componente fásico se ha descrito en algunos tipos de músculo liso que no generan fácilmente P.A., por ejemplo en cápsula esplénica (BOSE y INNES, 1975), musculatura traqueal (KIRKPATRICK et al. 1975), aorta de conejo (BOHR, 1963) y arteria intestinal de perro (WAUGH, 1962); aunque bien es cierto que en estos casos, el componente fásico es sólo un poco mayor que el tónico y el tamaño global de la contracción es más pequeño.

Lo más frecuente en músculos que no producen con facilidad P.A., es que el ClK origine un aumento gradual de la tensión hasta llegar a un máximo para después recuperar la basal (VAN BREEMEN et al. 1973).

Por otra parte, HURWITZ et al. (1980) discrepan de lo anteriormente expuesto y concluyen, que tanto el componente fásico como el tónico de la respuesta contráctil originada por ClK son independientes de la existencia o no de P.A..

En preparación FL-PM de ileon de cobayo, las diferencias de tensión observables en las contracciones muscula-

res provocadas por CLK dependen del flujo de entrada de Ca^{++} al interior celular desde el medio externo (HURWITZ et al. 1980). Otros autores puntualizan más esta apreciación y sugieren que esta preparación sumergida en un baño que contenga una solución hiperpotásica sufrirá una depolarización de membrana mantenida (BURNSTOCK y STRAUB, 1958; HOLMAN, 1958; SPERELAKIS, 1962), como consecuencia de ésta se produce una apertura o ensanchamiento de los canales de Ca^{++} tipo VOC situados en la membrana celular con la subsiguiente entrada de Ca^{++} a través de ellos (BOLTON, 1979; LAWSON y CAVERO, 1989) y la aparición de la contracción muscular (SPERELAKIS, 1962; URAKAWA et al. 1970; KURIYAMA et al. 1975).

Parece claro pues, que las soluciones hiperpotásicas actúan disminuyendo el gradiente de K^+ , lo que provoca una depolarización de la membrana celular y la consiguiente entrada de Ca^{++} (KURIYAMA, 1963; KURIYAMA et al. 1971).

Ambos componentes de la contracción originada por CLK (fásico y tónico) son inhibidos potentemente por verapamilo (HURWITZ et al. 1980), que se considera un inhibidor del flujo de Ca^{++} en músculo liso (GOLENHOFEN y LAMMEL, 1972; HAEUSLER, 1972) y cardíaco (KOHLEHARDT et al. 1972), y lantano (HURWITZ et al. 1980), que se sabe que es un fármaco que compite con el Ca^{++} por sus puntos de unión en la membrana celular (VAN BREEMEN et al. 1972); mientras que el nifedipi-

no, fármaco antagonista del Ca^{++} que actúa selectivamente sobre canales de Ca^{++} VOC tipo L ó lentos (LAWSON y CAVERO, 1989), es un potente inhibidor de la contracción tónica, y menos intensamente de la fásica, siendo la diferencia significativa (GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987).

Parece ser que ambos componentes de la respuesta contráctil inducida por ClK están mediados por la apertura de canales de Ca^{++} tipo VOC pero diferentes (HURWITZ et al. 1980).

Existen diferentes teorías sobre la identificación de estos tipos de canales.

GOLENHOFEN (1976) y BOEV et al. (1976) denominaron a estos tipos de canales VOC:

- Sistema P: Los cuales estarían relacionados con la producción del componente fásico.
- Sistema T: Los cuales estarían relacionados con la producción del componente tónico.

COLLIS y SHEPHERD (1979) han sugerido la existencia de dos tipos de canales distintos basándose en las diferencias existentes entre las contracciones producidas por ClK y Ach en vena safena aislada de perro, y aunque ambos canales estarían relacionados con la movilización de Ca^{++} extracelular diferirían en el número y en otros aspectos,

de tal forma que:

- El canal activado por Ach es independiente de la depolarización de membrana y presenta una gran sensibilidad a isoproterenol y muy poca a verapamilo.

- El canal activado por K^+ es también independiente de la depolarización de membrana, pero es relativamente sensible al isoproterenol y muy sensible al verapamilo.

Los tipos de canales que proponen HURWITZ et al. (1980) no concuerdan con los descritos hasta aquí, y creen que son canales que se abren porque el K^+ provoca una depolarización lenta y sostenida de la membrana plasmática, y no es que se diferencien de otros canales operados por otros agentes excitatorios, sino que, simplemente no constituyen una población homogénea.

Por otra parte se ha descrito que el K^+ no afecta a la salida de Ca^{++} desde el interior celular (CHUJYO y HOLLAND, 1963) o la incrementa (CARPENTER y RUBIN, 1967).

Además las soluciones hiperpotásicas liberan Ach y NA de sus respectivas terminaciones nerviosas y, al menos, en algunos tipos de músculo liso, esta liberación de transmisores contribuye a la formación de la respuesta contráctil (LORENZ y VAN HOUTTE, 1975; SHIBATA et al. 1978).

En apoyo de esta afirmación ANDERSSON y DJÄRV (1978) en estudios realizados en músculo de colon de conejo, observaron que las soluciones hiperpotásicas producen alteraciones sobre los niveles de nucleótidos cíclicos provocando un aumento del GMPc y una disminución inicial y pasajera de los niveles de AMPc, seguida de un incremento de los mismos; pues bien, al atropinizar la preparación, el incremento en los niveles de GMPc permanecía constante, pero el decremento inicial en los valores de AMPc desaparecía, por lo que pensaron que debía estar mediado por una liberación de Ach originada por el K^+ .

Por otra parte, los fármacos colinérgicos han demostrado producir una disminución transitoria de AMPc (ANDERSSON, 1973), y además PATON y ZAR (1968) demostraron que los iones de K^+ provocaban la liberación de Ach en preparaciones de músculo liso intestinal.

En contra de todo esto, se encuentran los resultados obtenidos por HURWITZ et al. (1980), los cuales trabajando en músculo liso intestinal reprodujeron las respuestas contráctiles provocadas por K^+ antes y después de atropinizar las preparaciones sin obtener modificación alguna en sus resultados, por lo que concluyeron que la liberación de Ach no está relacionada con la producción de la respuesta contráctil provocada por K^+ en músculo liso intestinal.

Se puede resumir, por tanto, que:

- El K^+ provoca una respuesta contráctil en la preparación FL-PM de ileon de cobayo en la que se diferencian dos componentes: uno rápido (fásico) y uno lento (tónico).

- La contracción originada por el K^+ está relacionada con el paso de iones de Ca^{++} a través de los VOC.

- Ambos componentes de la contracción inducida por K^+ pueden ser inhibidos de forma variable por fármacos antagonistas del Ca^{++} .

- La Ach, posiblemente, no está relacionada con la producción de la respuesta contráctil originada por K^+ .

I.5. FARMACOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO

I.5.1. DEFINICION

De acuerdo con FLECKENSTEIN (1977), un fármaco antagonista del Ca^{++} es aquel que inhibe la corriente lenta de entrada de Ca^{++} al interior celular de una manera dosis-dependiente y cuyo efecto debe ser reversible por iones de Ca^{++} .

Desde el punto de vista farmacológico el término "antagonista del Ca^{++} " puede estar sujeto a debate, puesto que, un fármaco antagonista es aquel que inhibe los efectos

de otro (Atropina vs Ach o Propranolol vs Isoprenalina).

El Verapamilo y otros antagonistas del Ca^{++} , sin embargo, no inhiben el efecto de los iones de Ca^{++} , sino que más bien, impiden el paso de los iones de Ca^{++} a través de canales específicos situados en las membranas celulares. Por esta razón se ha denominado a este grupo heterogéneo de fármacos "bloqueadores de la entrada de Ca^{++} " (VAN HOUTTE Y BOHR, 1981), "bloqueadores de los canales lentos de Ca^{++} " (BOU et al. 1983) o "inhibidores de los canales lentos de Ca^{++} " (NAYLER y POOLE-WILSON, 1981).

Posteriormente VAN ZWIETEN (1985) propuso la siguiente definición: "Los bloqueadores de la entrada de Ca^{++} " son compuestos cuyo mayor efecto es la inhibición selectiva del flujo lento de entrada de Ca^{++} que atraviesa la membrana celular por un canal apropiado en condiciones fisiológicas. El efecto debe ser reversible por iones de Ca^{++} ".

Ciertos derivados del difenilmetilo, de los que la flunarizina es el representante mejor conocido poseen una débil actividad antagonista del Ca^{++} en condiciones fisiológicas (TRIGGLE y SWAMY, 1983; WAUQUIER, 1982), mientras que son muy eficaces y potentes inhibidores de la sobrecarga masiva de Ca^{++} que se produce en determinadas situaciones patológicas (isquemia). BORGERS (1985) propone para la fluna

rizina y fármacos afines la denominación de "bloqueadores de la sobrecarga de Ca^{++} ".

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) sugirió al comité de expertos, discutir la definición y la clasificación de los fármacos utilizados para interferir el manejo del Ca^{++} por las células de los diferentes tejidos. Dicho comité llegó a la conclusión de que, aunque el término "antagonistas del Ca^{++} " no es totalmente correcto, por razones históricas y, sobre todo, con motivo de simplificar el tema, debía utilizarse preferentemente esta nomenclatura a la de "bloqueantes de la entrada de Ca^{++} " o "bloqueantes de los canales de Ca^{++} " u otros similares (VAN HOUTTE, 1987).

Por tanto, la terminología de "antagonistas del Ca^{++} " es la que se emplea comunmente a lo largo de esta Tesis Doctoral; aunque se respetará la utilizada por cada autor al hacerle referencia.

Existen otras sustancias, no relacionadas en forma alguna con los fármacos antagonistas del Ca^{++} (algunos anestésicos locales, quinidina, lidocaina) que son capaces de actuar sobre el canal lento de Ca^{++} a la vez que bloquean el canal rápido de Na^+ . Estos fármacos no se denominan antagonistas del Ca^{++} , sino bloqueantes del canal de Na^+ (VAN ZWIETEN, 1985). De la misma forma no tiene sentido incluir

fármacos como prenilamina, teofilina o morfina entre los antagonistas del Ca^{++} , sólo porque tienen un débil efecto antagonista del Ca^{++} junto a otros efectos preferenciales mucho más potentes (BOU et al. 1983).

I.5.2.- CLASIFICACION

Como ya se ha citado anteriormente el grupo farmacológico de los antagonistas del Ca^{++} es sumamente heterogéneo. Si ésto ya originaba controversia a la hora de designar una nomenclatura y definición adecuadas, aún más al intentar clasificarlos. Así existen diferentes clasificaciones en función del autor que lo proponga.

En esta Tesis Doctoral se citan algunas de las más importantes.

KAZDA et al. (1983), sugieren que no existen fármacos absolutamente específicos, y los antagonistas del Ca^{++} no son la excepción. Sin embargo, FLECKENSTEIN (1981) basándose en la especificidad para inhibir la corriente lenta de Ca^{++} que poseen estos fármacos, los clasificó en dos grupos:

GRUPO A: - Se incluyen fármacos específicos y de potente acción que inhiben el complejo excitación/contracción dependiente de Ca^{++} hasta un 90% antes de

afectar a la corriente rápida de Na^+ .

- Se subdividen en tres grupos:

- . I.- Fármacos "verapamilo-like": Verapamilo y Gallopamil.
- . II.- Fármacos "Nifedipino-like": Nifedipino, Niltrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nicardipino, etc....
- . III.- Fármacos "Diltiazem-like": Diltiazem.

- GRUPO B: - Son fármacos menos potentes y específicos que los del grupo A. Inhiben el complejo excitación/contracción dependiente de Ca^{++} en un 50-60% antes de afectar a la corriente rápida de Na^+ .

- Se incluyen: Prenilamina, Perhexelina, Bepridil, Cinarizina, Flunarizina.

Otra clasificación es la propuesta por KAUFMANN et al. (1982). Se basa en los efectos de los antagonistas del Ca^{++} sobre el denominado fenómeno en "escalera" o fenómeno BOWDIRCH en preparaciones de músculo papilar aislado de gato. El aumento de la amplitud de la contracción provocado al aumentar la frecuencia (fenómeno de "escalera"), se puede modificar de tres maneras por los antagonistas del Ca^{++} en este tipo de preparaciones:

- GRUPO I.- Disminuyen o revierten la relación amplitud-fre-

cuencia.

- Se incluyen: Verapamilo, Diltiazem y Fendiline.

- GRUPO II.- Tienen poco efecto sobre la relación amplitud-frecuencia.

- Se incluyen: Nifedipino y Prenilamina.

- GRUPO III.- Provocan un incremento en la respuesta contráctil. Su efecto inotropo (-) desaparece a altas frecuencias.

- Se incluyen: Perhexelina y Benciclán.

La característica de tiempo-dependencia y la reversibilidad de los efectos inhibitorios de los fármacos antagonistas del Ca^{++} en preparaciones de ciego de cobayo, fueron los fundamentos para la clasificación que propuso SPEDDING en 1982:

1.- Dihidropiridinas (DHP): - Se unen a algún punto específico del canal.

- Se incluyen Nifedipino, Nimodipino, Nisoldipino, Nitrendipino, etc...

2.- Verapamilo y Diltiazem: - Son fármacos que pueden regular positiva o negativamente la unión de las dihidropiridinas en su lugar específico por un mecanismo alostérico.

3.- Difenilpiperacinas: - Son fármacos con una marcada Ca^{++} /

dependencia.

- Se incluyen: Flunarizina y Cinarizina.

GODFRAIND et al. (1986) propusieron la siguiente clasificación:

GRUPO I.- Bloqueantes de la entrada de Ca^{++} :

- Subgrupo I-A: Sustancias selectivas para los canales lentos del Ca^{++} en el miocardio (bloqueadores de los canales lentos):
 - Fenilalquilaminas: Verapamilo y Gallopamil.
 - Dihidropiridinas: Nifedipino, Nitrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nicardipino, etc...
 - Benzotiazepinas: Diltiazem.
- Subgrupo I-B: Sustancias con acción no percibida sobre la corriente lenta de entrada de Ca^{++} en el miocardio.
 - Difenilpiperacinas: Cinarizina y Flunarizina.

GRUPO II.- Bloqueantes no selectivos de la entrada de Ca^{++} :

- Subgrupo II-A: - Sustancias que actúan en los canales de Ca^{++} y en los canales rápidos de Na^+ .
 - Bepridil.

- Subgrupo II-B: - Sustancias que actúan sobre los canales de Ca^{++} teniendo otro lugar primario de acción.

En la Tabla 1, podemos observar otras clasificaciones propuestas por diferentes autores y algunas de las reseñadas específicamente en este apartado.

1.5.3.- ESTRUCTURA QUIMICA

Desde un punto de vista químico, los fármacos antagonistas del Ca^{++} forman, como no, un grupo muy heterogéneo; hasta el punto de que no ha sido posible realizar una clasificación satisfactoria basándose en la estructura química.

En la Figura 6, se representa de manera esquemática la estructura química de algunos fármacos antagonistas del Ca^{++} .

El Verapamilo y el Gallopamil, están relacionados, al menos químicamente, con los beta-bloqueantes, aunque no poseen una actividad antagonista beta significativa.

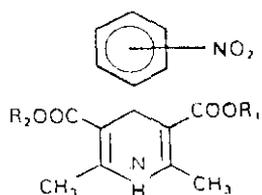
El Diltiazem, como derivado benzotiazepínico, muestra algún parecido con las benzodiazepinas, aunque éste es meramente químico, no farmacológico.

TABLA 1

DISTINTAS CLASIFICACIONES DE LOS ANTAGONISTAS DE Ca
EN LA LITERATURA (Tomado de Spedding, 1985a)

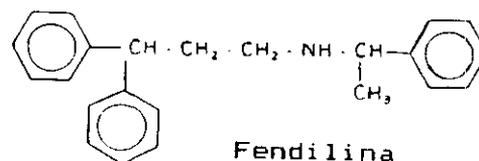
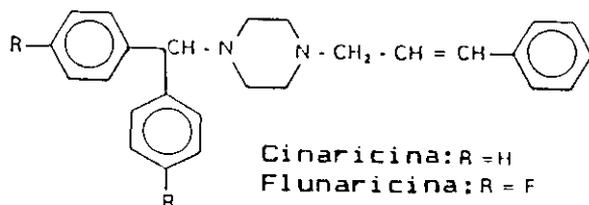
	Dihidro- piridi- nas	Verapamil	Diltiazem	Difenil- piper- cinas
Fleckenstein	I	I	I	II
Glossman et al.	IA	II	III	IB
Rodermkirchen et al.	II	I	I	III
Murphy et al.	I	II	II	II
Spedding	I	II	II	III

DIHIDROPIRIDINAS

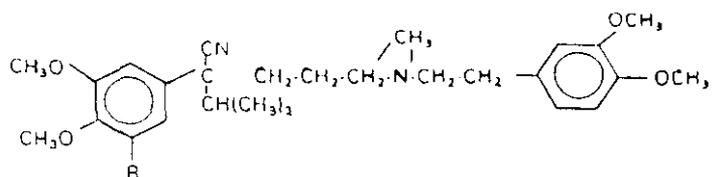


	R ₁	R ₂	Pos NO ₂
Nifedipino	CH ₃	CH ₃	2 NO ₂
Nimodipino	(CH ₃) ₂ CH	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	3 NO ₂
Nitrendipino	CH ₃	C ₂ H ₅	3 NO ₂
Nicardipino	CH ₃	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ Ph	3 NO ₂

DIFENILPIPERACINAS



FENILALQUILAMINAS



Verapamilo: R = H
Galopamil: R = OCH₃

BENZOTIAZEPINAS

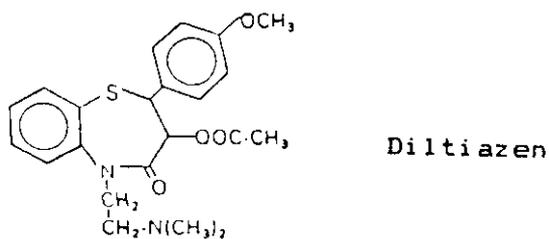


FIGURA 6

Estructura química de algunos de los más importantes antagónistas del Ca⁺⁺.

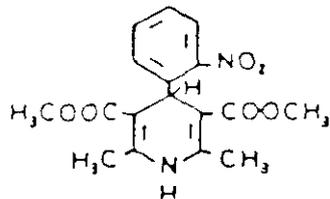
Se ha propuesto una relación estructura-actividad para las dihidropiridinas (MANDEHOLD et al. 1982; RODENKIRCHEN et al. 1982), cuya estructura química se representa en la Figura 7. Otros autores como KAZDA et al. (1983) piensan que las diferencias físico-químicas entre los antagonistas del Ca^{++} , y especialmente entre las dihidropiridinas, son las responsables de su especificidad tisular. El comité de expertos de la O.M.S. sugirió que existe relación entre la estructura y la actividad de estos fármacos, basándose, tal vez, en que fármacos pertenecientes al mismo subgrupo (dihidropiridinas), con estructuras químicas muy similares tuvieran efectos tan dispares (agonismo y antagonismo) (VAN HOUTTE, 1987).

I.5.4.- MECANISMO DE ACCION DE LAS DIHIDROPIRIDINAS

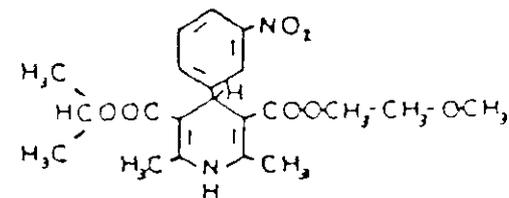
I.5.4.1.- PUNTO DE UNION DE LAS DIHIDROPIRIDINAS.

Sabemos que los agonistas y antagonistas del Ca^{++} de tipo dihidropiridínico, actúan sobre canales de Ca^{++} VOC, y más específicamente sobre el subtipo L (lento) (NILIUS et al. 1985; NOWICKI et al. 1985; HIRNING et al. 1988). También sabemos que la inactivación de los VOC sucede por dos mecanismos, depolarización y/o acumulación de Ca^{++} en el extremo citoplasmático del canal (ECKERT y CAHD, 1984; GREENBERG et al. 1985b).

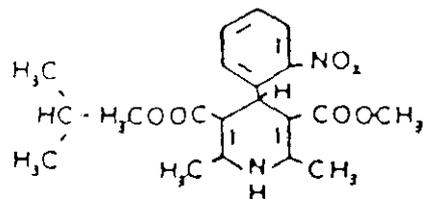
NIEEDIPINO
(BAY a 1040)



NIMODIPINO
(BAY e 9736)



NISOLDIPINO
(BAY k 5552)



NITRENDIPINO
(BAY e 5009)

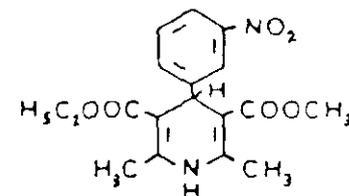


FIGURA 7

Estructura química de las dihidropiridinas antagonistas del Ca⁺⁺ utilizadas en la realización de esta Tesis Doctoral.

Parece claro que para que un fármaco produzca su efecto debe acoplarse en su punto de destino o "punto de unión". Las dihidropiridinas se unen en un punto de la membrana que está asociado a los canales del Ca^{++} tipo VOC (GLOSSMAN et al. 1982). Esta unión de las dihidropiridinas es saturable, tiene alta afinidad (su constante de disociación es baja: $K_d = 0.1-3 \text{ nM}$) y se puede interferir de manera competitiva por otras dihidropiridinas, difenilalquilaminas y los inhibidores de la calmodulina (GLOSSMAN et al. 1982; MURPHY et al. 1983) y de manera alostérica el Verapamilo disminuye la intensidad de esta unión, mientras que el Diltiazem, la aumenta (GLOSSMAN et al. 1982).

El estudio de estos puntos de unión de alta afinidad se mejoró considerablemente con la inclusión en los trabajos de investigación de dihidropiridinas marcadas (^3H DHP).

Así se encontró que el lugar de máxima densidad (B_{max}) de estos puntos de unión dependía del ligando utilizado (FERRY et al. 1983a) mientras que en otros estudios, utilizando diferentes ligandos se hallaron valores de B_{max} similares (VENTER et al. 1983; JANNIS et al. 1984a,b) LEE et al. 1984; GREENBERG et al. 1985b).

Por otra parte, también se ha descrito un segundo

punto de unión de baja afinidad para dihidropiridinas, concretamente [^3H]Nitrendipino, en el corazón (BELLEMAN et al. 1981; VAGHY et al. 1984a; VAGHY et al. 1984b), arterias (TRIGGLE et al. 1982) y cultivos de miocitos cardíacos (MARSH et al. 1983).

Trabajos más recientes recogen la existencia de un punto de unión para otra dihidropiridina ([^3H]Nimodipino) en glóbulo rojo humano con unas características muy particulares (relativamente baja afinidad y estereoselectividad inversa al punto de unión clásico de las dihidropiridinas) (STRIESSNIG et al. 1985a,b).

GREEN et al. (1985) y SCHWARTZ et al. (1985) describen la presencia de puntos de unión de baja afinidad, que al reducirse el potencial de membrana se transforman en puntos de alta afinidad.

- Localización subcelular de la unión de las Dihidropiridinas.

El punto de unión de las dihidropiridinas difiere en su localización en función del tipo de célula del que se trate. Así, en células de músculo liso la localización de los puntos de unión específicos para estos fármacos se encuentran íntimamente ligado a la membrana plasmática (GRO-

VER et al. 1984; GODFRAIND y WIBO, 1985), mientras que en células de músculo esquelético, se encuentra en los túbulos T (FOSSET et al. 1983; BRANDT, 1985).

Por otra parte, estudios realizados mediante autorradiografía con ^3H Nitrendipino en cerebro de rata, indicaron una distribución preferencial de los puntos de unión en zonas de sinapsis (MURPHY et al. 1982). Estos datos sobre Sistema Nervioso Central (SNC) han sido corroborados posteriormente por otros autores (JANIS y SCRIBINE, 1983; SNYDER 1984; MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985) que además sugieren, que estos puntos de unión están en, o se encuentran ligados a canales de Ca^{++} . Trabajos realizados por BELLEMAN et al. (1983) con ^3H Nimodipino atribuyen a estos puntos propiedades como saturabilidad, reversibilidad y estereoselectividad.

Más recientemente se ha descrito, que el punto de unión de las dihidropiridinas está relacionado con algún lugar clave del canal de Ca^{++} tipo VOC, probablemente, un sensor de voltaje (BRUM y RIOS, 1986).

Sin embargo, no todos los canales de Ca^{++} tipo VOC tienen alta afinidad por las dihidropiridinas; además la afinidad de éstas por sus puntos de unión varía, en amplio margen, en función del estado del canal (TRIGGLE, 1988).

- Características fisico-químicas de los puntos de unión de las Dihidropiridinas.

El punto de unión de las dihidropiridinas es termosensible (MARANGOS et al. 1982), de tal forma que al disminuir la temperatura de 37°C a 0°C, disminuye la K_d aunque no se afecta la B_{max} . de los mismos (GLOSSMAN et al. 1985). Esta termosensibilidad desaparece al tratar dicho punto de unión con fosfolípidos (GLOSSMAN et al. 1982; FOSSET et al. 1983; BOLGER et al. 1983).

El punto de unión parece estar constituido por una glicoproteína (CURTIS y CATTERALL, 1984), que probablemente está engarzada alostéricamente a puntos de unión para otras clases estructurales de ligandos de canales de Ca^{++} (TRIGGLE, 1988). Esta idea concuerda con el modelo propuesto por GLOSSMAN et al. (1985) (Figura 8).

La glicoproteína, tiene un PM variable según su localización: SNC y músculo esquelético 200.000 (FERRY et al. 1983b; GOLL et al. 1983; NORMAN et al. 1983); ileon 280.000 (VENTER et al. 1983). Al purificarla se han obtenido tres polipéptidos con diferentes PM: 160.000, 55.000 y 33.000 (CURTIS y CATTERALL, 1984), incluso se han identificado componentes no polipeptídicos de PM 60.000 (RENGASAMY et al. 1985).

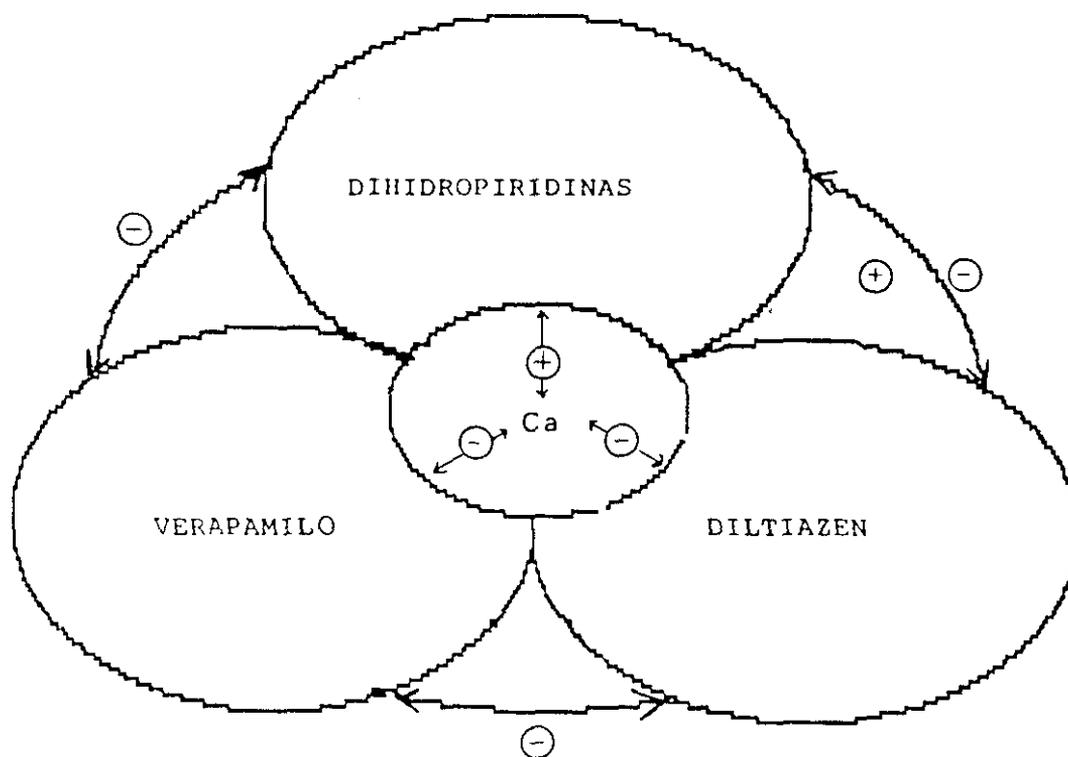


FIGURA 8

Modelo de los puntos de unión para dihidropiridinas, verapamilo y diltiazem en el canal de Ca^{++} , según GLOSSMAN et al. (1985). Las flechas simbolizan la interacción alostérica positiva (+) o negativa (-) entre subunidades y con el lugar o lugares de unión del Ca^{++} .

GALIZZI et al. (1986) encontraron que los puntos de unión para dihidropiridinas y los de otros antagonistas del Ca^{++} se encuentran en una sola cadena polipeptídica de PM 170.000.

El acoplamiento de las dihidropiridinas en su punto de unión depende de la presencia de cationes divalentes, incluyendo Ca^{++} (GOULD et al. 1982; TRIGGLE y JANIS, 1984; GLOSSMAN y FERRY, 1985), lo que puede sugerir que dicho punto de unión esté engarzado a un lugar de interacción catiónica asociada con la función del canal (TRIGGLE, 1988). Una vez que la dihidropiridina se acopla en su punto de unión (excepto en el caso del BAY K 8644) induce la fosforilación de una proteína de PM 32.000 constitutiva del mismo (HORNE et al. 1984).

I.5.4.2.- INTERACCIONES ENTRE DISTINTOS TIPOS DE ANTAGONISTAS DEL Ca^{++} EN EL PUNTO DE UNION DE LAS DIHIDROPIDINAS.

- Efecto de las difenilpiperacinas:

Flunaricina y Cinaricina, son fármacos capaces de desplazar completamente a las dihidropiridinas de su lugar de unión (HOLCK et al. 1982; BOLGER et al. 1983; LINDNER et al. 1984), incrementando la disociación entre dihidropi-

ridina y su receptor, tal vez de forma alostérica, como lo hace el Verapamilo (MURPHY et al. 1983; MESSING et al. 1985). Dicha acción es más potente en ileon, que en corazón o cerebro (EHLERT y YAMAMURA, 1984).

- Efecto de las fenilalquilaminas:

Verapamilo y Gallopamil inhiben la unión de las dihidropiridinas de manera concentración-dependiente hasta un máximo de 30-60% en la mayoría de los estudios realizados en cerebro, corazón y membrana de músculo liso (FERRY et al. 1985).

- Efecto del Diltiazem:

Los resultados obtenidos con este fármaco son muy dispares, probablemente debido a la gran influencia de la temperatura en la acción del D-cis-Diltiazem, aunque, en general, puede considerarse su interacción con el punto de unión de las dihidropiridinas, como alostérica positiva (DE POVER et al. 1983; BOLES et al. 1984; FERRY y GLOSSMAN, 1984).

- Efecto de las Dihidropiridinas en la unión de otros antagonistas del Ca^{++} :

- Fenilalquilaminas (Verapamilo):

Las dihidropiridinas impiden la unión del Verapamilo a su receptor de manera esteroespecífica y a las mismas concentraciones que precisan para unirse a sus puntos de unión en músculo esquelético (GALIZZI et al. 1984; GOLL et al. 1984) o hipocampo (FERRY et al. 1984).

Por otra parte, hay trabajos que describen que el ^3H Nitrendipino no inhibe la unión del Verapamilo a sus receptor, probablemente, porque el receptor de éste se encuentra localizado en la cara interna de la membrana celular, y allí las dihidropiridinas, no actúan (GARCIA et al. 1984).

- Diltiazem:

El efecto de las dihidropiridinas es temperatura-dependiente. Así en músculo esquelético y a baja temperatura, impiden la unión del D-cis-diltiazem, pero conforme aumenta la temperatura este efecto se invierte, probablemente por aumento de la B_{max} . para el diltiazem (GLOSSMAN et al. 1983b).

I.5.4.3.- CORRELACION ENTRE ACOPLAMIENTO Y ACTIVIDAD FARMACOLOGICA.

- Músculo liso.

Se han realizado muchos trabajos en musculatura

lisa intestinal, que comparan la afinidad de las dihidropiridinas por su punto de unión con su potencia farmacológica (BOLGER et al. 1982; BOLGER et al. 1983; GODFRAIND y WIBO, 1985).

Existe una correlación 1:1 entre la inhibición de la unión de ^3H Nitrendipino y la inhibición de la respuesta mecánica inducida mediante depolarización con K^+ . La respuesta provocada por estímulo de los receptores muscarínicos fue menos sensible al efecto inhibitorio de las dihidropiridinas, de tal forma que los valores IC_{50} necesarios para inhibir el componente tónico de la contracción inducida por Ach fueron 10 veces mayores que los que hicieron falta para inhibir el acoplamiento de las dihidropiridinas a su punto de unión (VENTER et al. 1983).

SPEEDING y BERG (1984) han observado que el BAY K 8644 (dihidropiridina con actividad agonista del Ca^{++}) no antagoniza el efecto inhibitorio que producen la difenilpiperacinas en las contracciones inducidas por Ca^{++} o por depolarización con K^+ en músculo liso no vascular y, sin embargo, sí revierte la inhibición producida por otras dihidropiridinas (antagonistas del Ca^{++}), Verapamilo o Diltiazem.

Por otra parte, en trabajos realizados en arteria mesentérica de rata y perro, la Kd de ^3H Nitrendipino, fue

20 veces menor que la IC_{50} de Nitrendipino necesaria para inhibir la contracción inducida por K^+ (WOLLHEIM et al. 1984), mientras que otros estudios realizados en miometrio de rata demuestran que la potencia inhibitoria de las dihidropiridinas en las contracciones inducidas por K^+ concuerda con la afinidad de éstas por su punto de unión (BATRA, 1985; GROVER y OAKES, 1985).

- Músculo cardíaco

El acoplamiento de las dihidropiridinas con su punto de unión, muestra características semejantes en las preparaciones de membrana de célula cardíaca y en las de músculo liso (GOULD et al. 1984; SARMIENTO et al. 1983).

Estudios realizados con fármacos similares a Nifedipino demostraron que no existe correlación entre afinidad por el punto de unión y potencia como agente inotrope (-) (JANIS et al. 1984b).

En general, los fármacos antagonistas del Ca^{++} tienen una potencia similar en músculo cardíaco y en músculo liso (SCHRAMM et al. 1983a,b).

- Músculo esquelético

La localización de los puntos de unión de las dihi

dropiridinas en los túbulos T está relacionada con la concentración de canales de Ca^{++} tipo VOC en esta zona (ALMERS et al. 1981). Algunas opiniones discrepan de ésta y sugieren que el número de puntos de unión es mucho mayor que el número de canales de Ca^{++} tipo VOC activados en esta zona (GLOSSMAN et al. 1983a) sin embargo, al igual que sucede en el músculo cardíaco, hace falta mayor concentración de fármaco para bloquear el paso de Ca^{++} a través del canal que para que se produzca el acoplamiento de la dihidropiridina con su receptor (ALMERS y McCLESKEY, 1984).

- Tejido nervioso

Los puntos de unión de alta afinidad para dihidropiridinas en el cerebro son muy similares a los descritos para músculo cardíaco y músculo liso.

Como se citó anteriormente (I.5.4.1), los puntos de unión a nivel cerebral no se circunscriben exclusivamente a los vasos sanguíneos, sugiriéndose una localización sináptica (MURPHY et al. 1982). MARANGOS et al. (1982) describe la distribución regional de los puntos de unión de DHP en el cerebro, de forma que, hipocampo, núcleo caudado y corteza cerebral presentaron una densidad de puntos de unión de 2 a 5 veces mayor que hipotálamo, cerebelo y tronco cerebral.

La densidad de puntos de unión para dihidropiridinas y su afinidad es dependiente de la edad en ratones y ratas (ERMAN et al. 1983; KAZAZOGLU et al. 1983; GOVONI et al. 1985). Por otra parte, sólo existen evidencias limitadas de que las dihidropiridinas sean eficaces en la regulación de la entrada de Ca^{++} en preparaciones neuronales (KWAN et al. 1985).

MIDDLEMISS y SPEDDING (1985) sugirieron que el BAY K 8644 favorecería que los canales de Ca^{++} presinápticos fueran más sensibles a los antagonistas del Ca^{++} orgánicos, debido a que produce un aumento en la liberación de 5-HT provocada por K^+ en cortex cerebral, y este efecto es antagonizado por bajas dosis de antagonistas de Ca^{++} .

Este peculiar comportamiento de los antagonistas del Ca^{++} , se ha tratado de explicar, sugiriendo que en el cerebro pueden existir canales de Ca^{++} que, bajo determinadas circunstancias, quedarían enmascarados (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985), o por la existencia de varios tipos de canales de Ca^{++} VOC, de los que sólo algunos son sensibles a dihidropiridinas (GODFRAIND et al. 1986) o porque algunos canales de Ca^{++} pierden su actividad en membranas aisladas (NILIUS et al. 1985).

Lo que parece claro es que los puntos de unión

para DHP en el cerebro deben tener un papel fisiológico llegando incluso a especular con la existencia de alguna sustancia endógena desconocida similar a DHP (RANKUMAR y EL-FAKAHANY, 1986).

I.5.4.4.- INTERACCION CON CALMODULINA.

La mayoría de las dihidropiridinas, el Verapamilo y el Diltiazem, tienen poca afinidad por la Calmodulina

(ITO et al. 1984). Sin embargo, existen coincidencias entre los antagonistas de la Calmodulina y los fármacos antagonistas del Ca^{++} que se podrían explicar por la existencia de una proteína con capacidad de unirse a estructuras similares a la Calmodulina, que se encuentra en, o está asociada al canal de Ca^{++} (JOHNSON, 1984; LUCHOWSKI et al. 1984).

En general, los antagonistas del Ca^{++} no producen efectos asociados al antagonismo de la Calmodulina, y es cuestionable si ésta, forma parte del canal de Ca^{++} y si es o no un receptor para algunos antagonistas de Ca^{++} (GOD-FRAIND et al. 1986).

I.5.4.5.- INTERACCION CON RECEPTORES ALFA-ADRENERGICOS.

En cierto sentido podría entenderse que los antago

nistas irreversibles alfa-adrenérgicos actúan reproduciendo los efectos de los antagonistas del Ca^{++} ; ya que son capaces de inhibir las contracciones provocadas por depolarización inducida por K^+ en aorta de conejo (SHIBATA y CARRIER, 1967) y en tenia coli de cobayo (SHIBATA et al. 1968), lo que sugeriría que son capaces de inhibir la depolarización provocada por entrada de Ca^{++} extracelular en el músculo liso (SHIBATA et al. 1968).

La Fenoxibenzamina (antagonista alfa-adrenérgico irreversible) bloquea irreversiblemente la unión de ^3H Niltrendipino con su receptor por disminuir la K_d sin afectar la B_{max} , probablemente por un efecto alostérico (GENGO et al. 1984).

Por otra parte, algunos antagonistas del Ca^{++} (Niltcardipino y Gallopamil) interactúan con receptores alfa₁-adrenérgicos y desplazan a sus ligandos específicos (PLOTTER y ATLAS, 1983).

Estos hechos han llevado a la hipótesis de que puede existir algún tipo de interacción entre receptores alfa-adrenérgicos y canales de Ca^{++} , y se ha planteado la posibilidad de que ambas estructuras se solapen en la membrana celular, de tal forma que un cambio en la configuración de una afecte a la otra (GODFRAIND et al. 1986).

I.5.4.6.- OTROS LUGARES DE INTERACCION.

Se han descrito otros lugares de actuación de los antagonistas del Ca^{++} en estudios realizados en membrana aislada y estructuras intracelulares aisladas; el estudio de estos lugares de acción, puede contribuir a tener un mejor perfil farmacológico de los antagonistas del Ca^{++} .

- Membrana plasmática.

- Intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$:

Algunas dihidropiridinas, como Nicardipino, inhiben hasta un 60% el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ en las vesículas endoplásmicas de la célula cardíaca (TAKEO et al. 1985). Este intercambio es un mecanismo muy importante para la salida del Ca^{++} de las células cardíacas. Es posible que la inhibición de este mecanismo por Nicardipino, explique por qué tiene menor efecto inotrope (-) que Nifedipino, a pesar de tener mayor afinidad por los canales de Ca^{++} (BRISTOW et al. 1984).

- Transporte de Ca^{++} dependiente de ATP:

El Nifedipino estimula el transporte de Ca^{++} dependiente de ATP en la célula cardíaca aproximadamente en 50-60% en sentido de dentro a fuera (DAVID DU-PILHO et al. 1984). Es posible que este mecanismo esté relacionado con

el efecto antihipertensivo del Nifedipino (GODFRAIND et al. 1986). HERSMEYER (1983) sugirió que el Nitrendipino tenía efectos similares sobre músculo liso vascular.

- Na^+/K^+ ATPasa:

Las dihidropiridinas ejercen diferentes efectos sobre la Na^+/K^+ ATPasa; así, el Nimodipino aumenta su actividad en membranas aisladas de aorta y en conducto deferente, aunque no lo hace ni en corazón ni en cerebro (PAN y JANIS, 1984). El Nitrendipino posee un efecto menor que Nimodipino y Nifedipino. Verapamilo y Diltiazem fueron totalmente inactivos.

- Nucleótido transportador:

En el apartado I.5.4.1., se menciona que existe un punto de unión en eritrocito humano para Nimodipino (STRIESSING et al. 1985a,b); dicho punto de unión se identificó como el nucleótido transportador de adenosina al interior celular (STRIESSING et al. 1985a). El Nimodipino, inhibe con gran potencia y de manera competitiva el transporte de adenosina al interior celular. Diltiazem y Verapamilo lo hacen con menos potencia (FORD et al. 1985).

- Retículo sarcoplásmico y mitocondria.

En general, los antagonistas del Ca^{++} pueden in-

fluir en el secuestro de Ca^{++} por las vesículas del retículo sarcoplásmico de músculo cardíaco y esquelético (COLVIN et al. 1982; WANG et al. 1984); aunque para ello requieren elevadas concentraciones de fármaco, siendo el Diltiazem, el que se ha mostrado más potente (HIRATA y INAMITSU, 1983).

I.5.5. CARACTERISTICAS FARMACOCINETICAS Y FARMACODINAMICAS DE LAS DIHIDROPIRIDINAS.

A pesar de que las dihidropiridinas son compuestos con una estructura química muy similar, poseen características farmacocinéticas y farmacodinámicas diferentes que se detallan a continuación.

I.5.5.1.- CARACTERISTICAS FARMACOCINETICAS

Debido al auge que ha experimentado el uso clínico de los antagonistas del Ca^{++} , y entre ellos de las dihidropiridinas, en los últimos 10 años, son muy numerosos los estudios realizados sobre el comportamiento farmacocinético de estas sustancias (KLEINBLOESEM et al. 1984; KUHLMAN et al. 1986; RÄMSCH et al. 1986; AHR et al. 1987; MEREDITH et al. 1988; KROL et al. 1988).

Las dihidropiridinas son compuestos que sufren un intenso metabolismo hepático (BAARNHIELM y HANSSON, 1986)

los metabolitos son inactivos y deshidrogenados (RÄMSCH y SOMMER, 1983; MEYER et al. 1983a,b; KANH et al. 1984; SCHERLING et al. 1987).

La absorción de las dihidropiridinas tras su administración vía oral (v.o.) es muy rápida cuando se administran en solución con agua y disolvente orgánico (polietilenglicol, etanol o cremophor) (RÄMSCH et al. 1986; AHR et al. 1987).

Las concentraciones plasmáticas máximas que alcanzan las dihidropiridinas están en relación con la dosis administrada, siendo, para dosis similares, el Nifedipino el que alcanza la concentración plasmática mayor, y el Nisoldipino la menor (RÄMSCH et al. 1986; AHR et al. 1987).

Tras la administración oral, la biodisponibilidad de estos compuestos es, en general, muy baja, probablemente debido a su intenso primer paso metabólico hepático (KLEIN-BLOESEM et al. 1984; RÄMSCH et al. 1986; VAN HARTEM et al. 1987) (Tabla 2).

La Figura 9, muestra como actúan los enzimas hepáticos sobre el núcleo principal de la molécula de las dihidropiridinas.

TABLA 2

PRINCIPALES PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE NIFEDIPINO, NIMODIPINO, NITRENDIPINO Y NISOLDIPINO TRAS INFUSION INTRAVENOSA CONTINUA (excepto *) (Modificado de Rämisch et al. 1986 y Ahr et al. 1987).

PARAMETRO	NIFEDIPINO	NIMODIPINO	NITRENDIPINO	NISOLDIPINO
ABSORCION*	90%	90%	80%	90%
BIODISPO- NIBILIDAD*	40-60%	5-10%	10-30%	2-4%
VOLUMEN DE DISTRIBU- CION (l/kg)	5,2	2,3	8,9 \pm 2,6	2,7
VIDA MEDIA (h)	9,9	1,5	12,4 \pm 4,2	7,7 \pm 9,7
UNION A PROTEINAS (%)	92-98	98	97-99	99
ACLARA- MIENTO (l/h)	0,6	18,7	35,4	11,2

*Administración via oral.

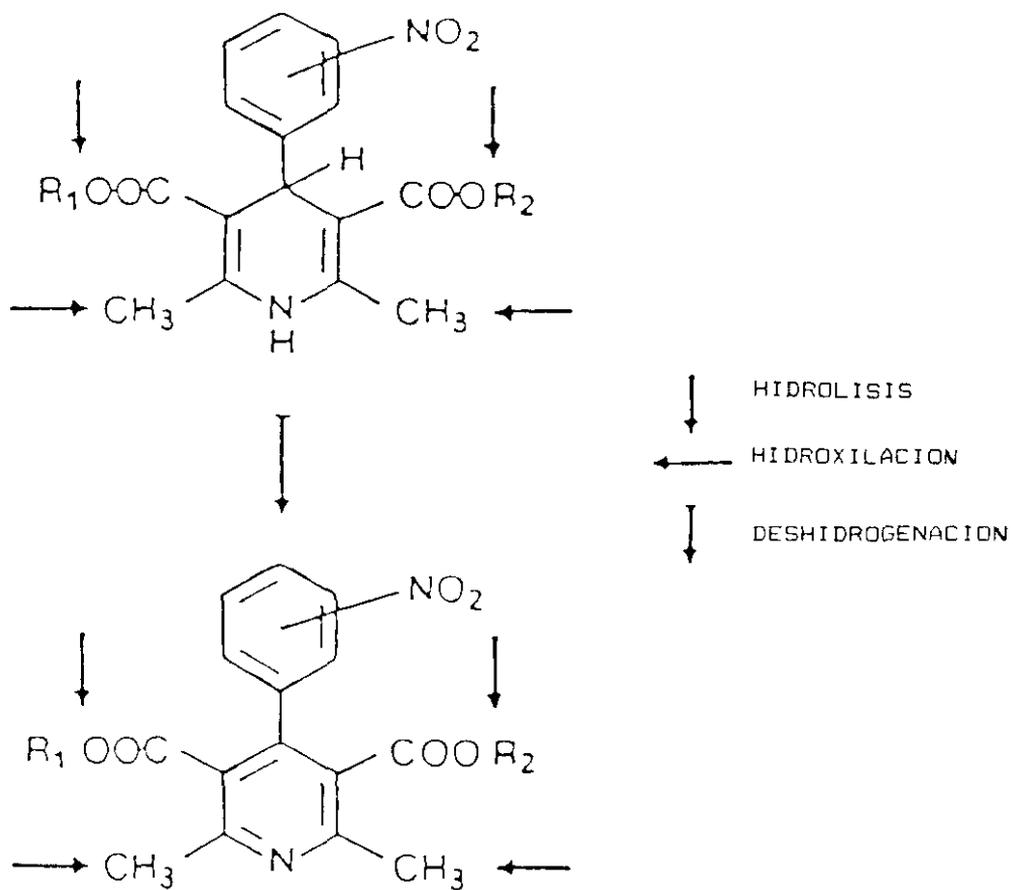


FIGURA 9

Modo de acción de los enzimas hepáticos en la molécula principal del núcleo de las DHP.

Los procedimientos más utilizados para detectar fármaco inalterado y/o sus metabolitos son: espectrometría de masas (HIGUCHI y SHIOBARA, 1978), cromatografía de gases con detección de captura electrónica (JAKOBSEN et al. 1979) y cromatografía líquida de alta presión (PIETTA et al. 1981).

En las Figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los metabolitos más importantes de las dihidropiridinas antagonistas del Ca^{++} utilizadas en la realización de este trabajo.

En resumen, se puede decir que las dihidropiridinas, sufren los siguientes pasos metabólicos (MEYER et al. 1983a,b; SCHERLING et al. 1987) (Fig. 9):

- 1.- Deshidrogenación del sistema 1,4 dihidropiridina.
- 2.- Hidrólisis de los grupos ésteres.
- 3.- Hidroxilación del grupo metilo.
- 4.- Conjugación con ácido glucurónico (sólo en bilis).

El Nifedipino, es una molécula con un bajo volumen de distribución tras un bolo de inyección intravenosa (RÄMSCH y SOMMER, 1983; KLEINBLOESEM et al. 1984) que consigue elevadas concentraciones plasmáticas en relación con la dosis (RÄMSCH et al. 1986); por otra parte, Nitrendipino, Nimodipino y Nisoldipino, alcanzan bajas concentraciones plasmáticas y tienen un buen volumen de distribución (RÄMSCH et al. 1986; AHR et al. 1987).

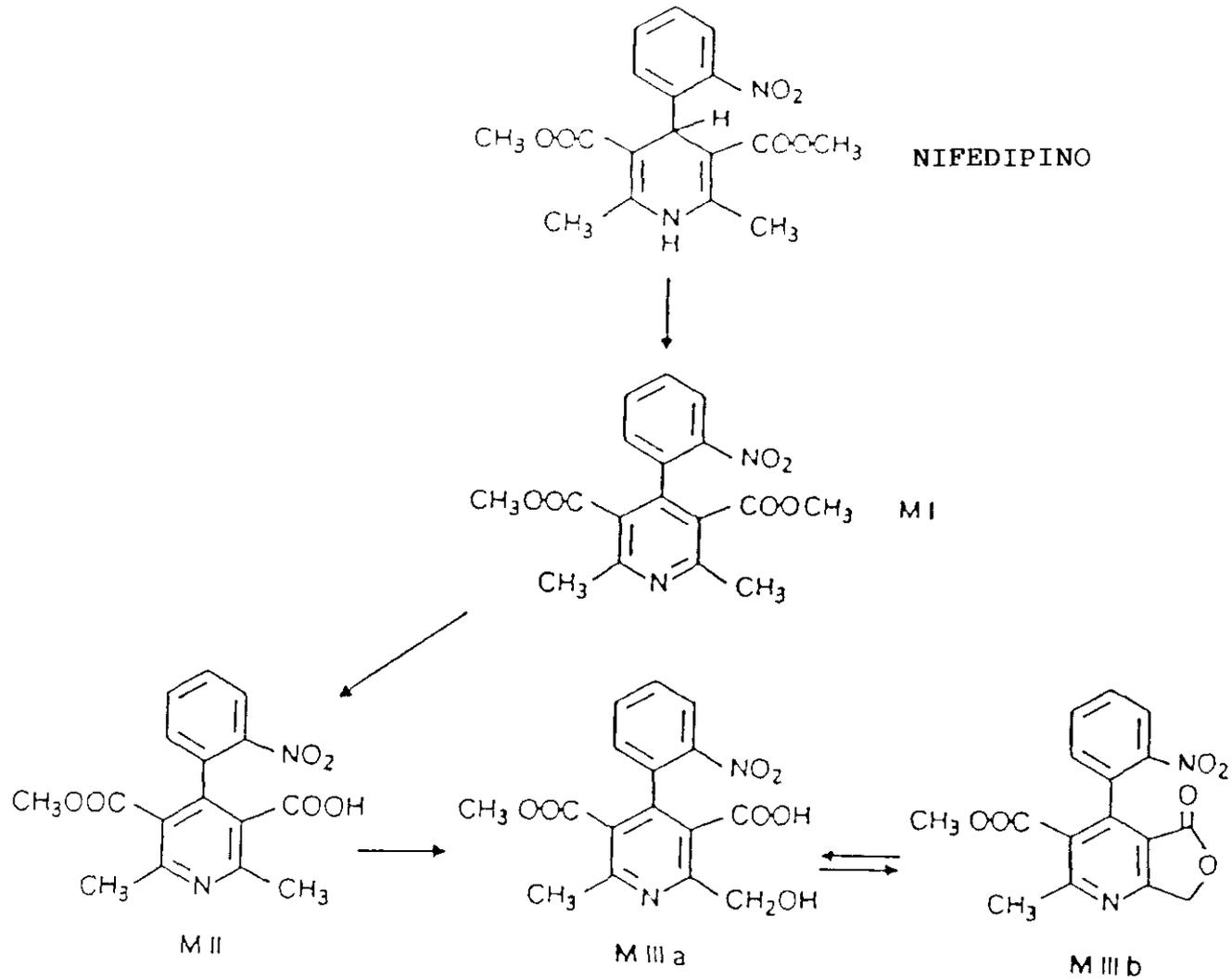


FIGURA 10

Ruta metabólica de NF y sus principales metabolitos.

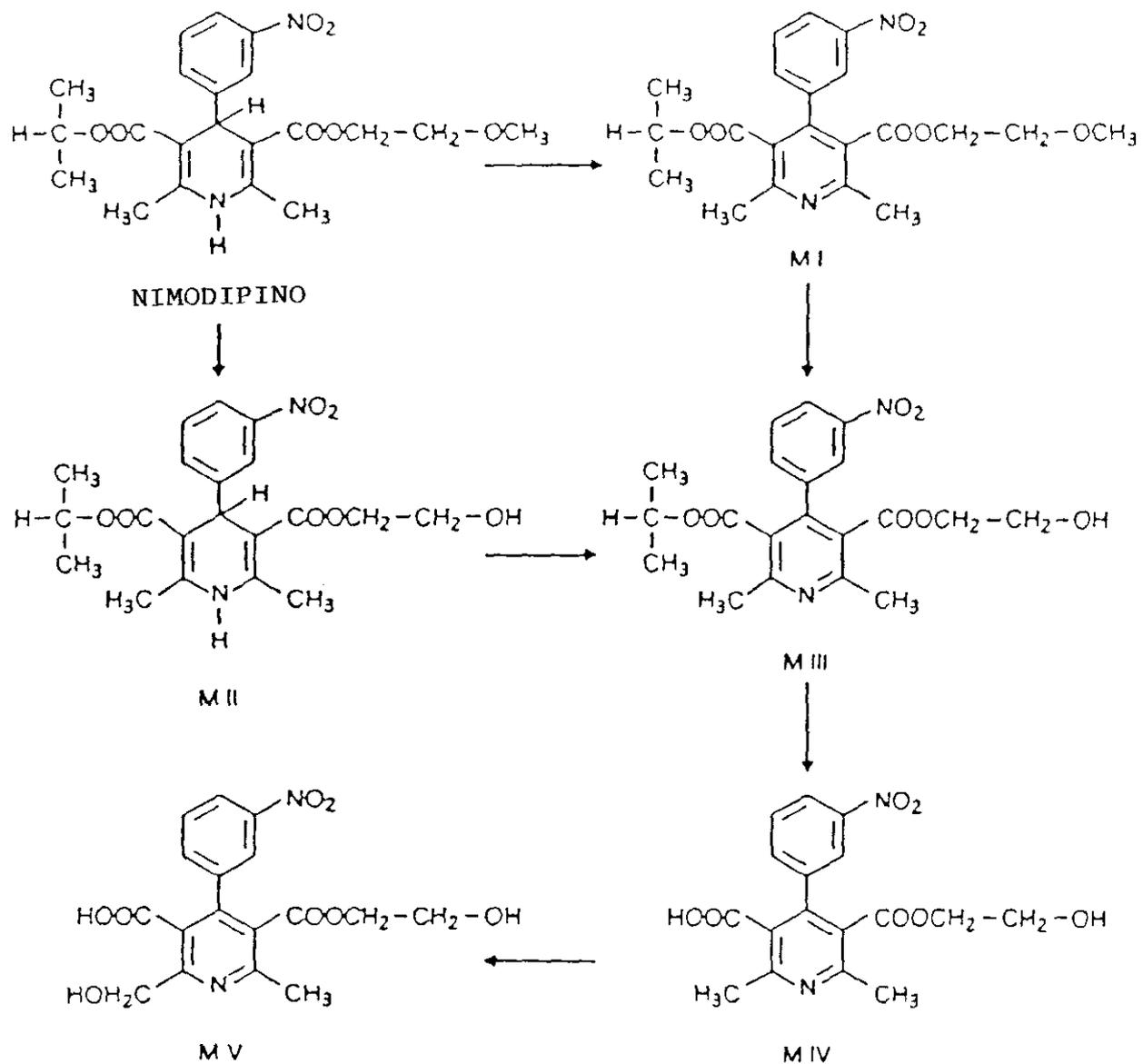


FIGURA 11

Ruta metabólica principal de NM y sus metabolitos más importantes.

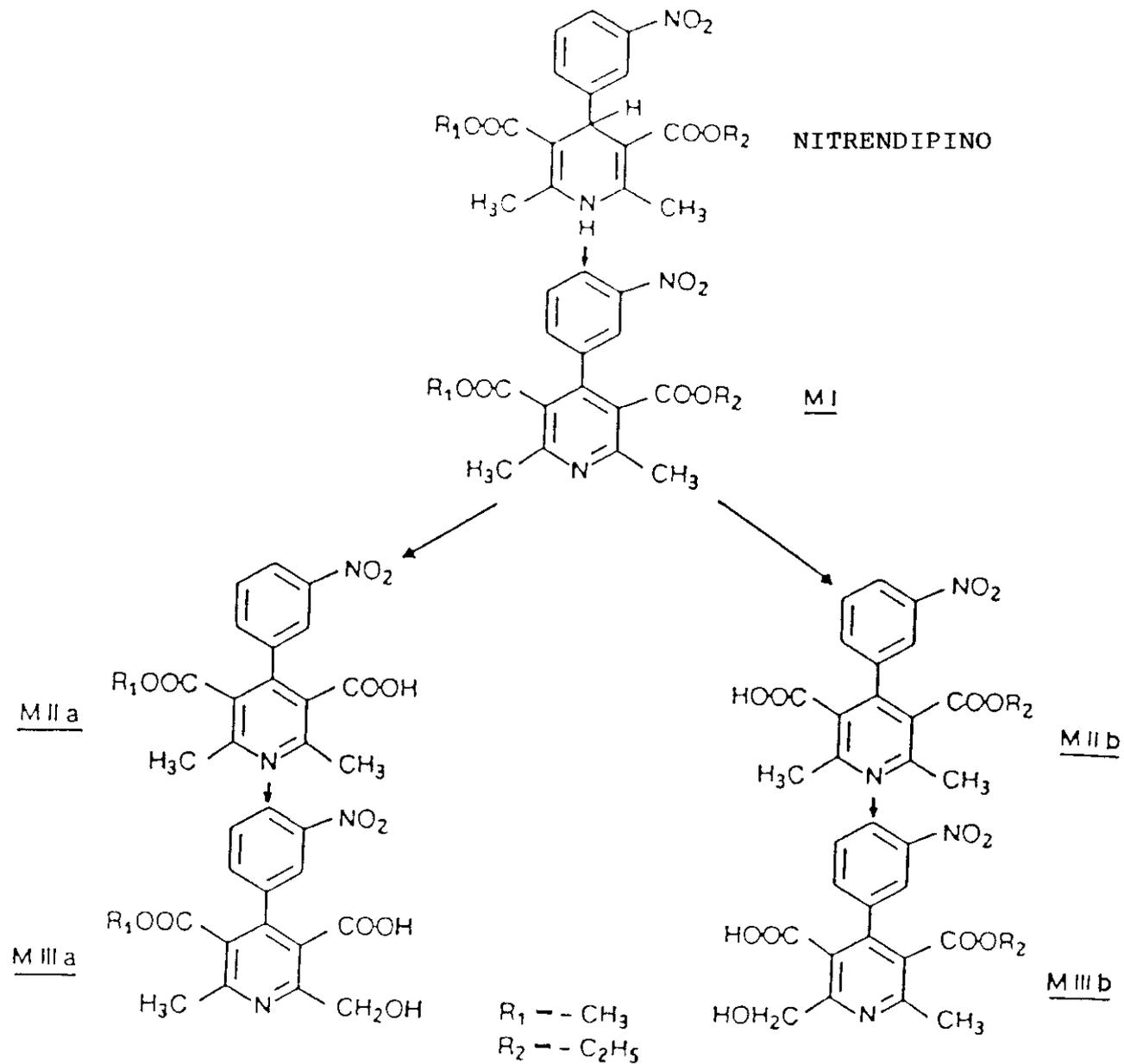


FIGURA 12

Ruta metabólica principal de NT y sus metabolitos más importantes.

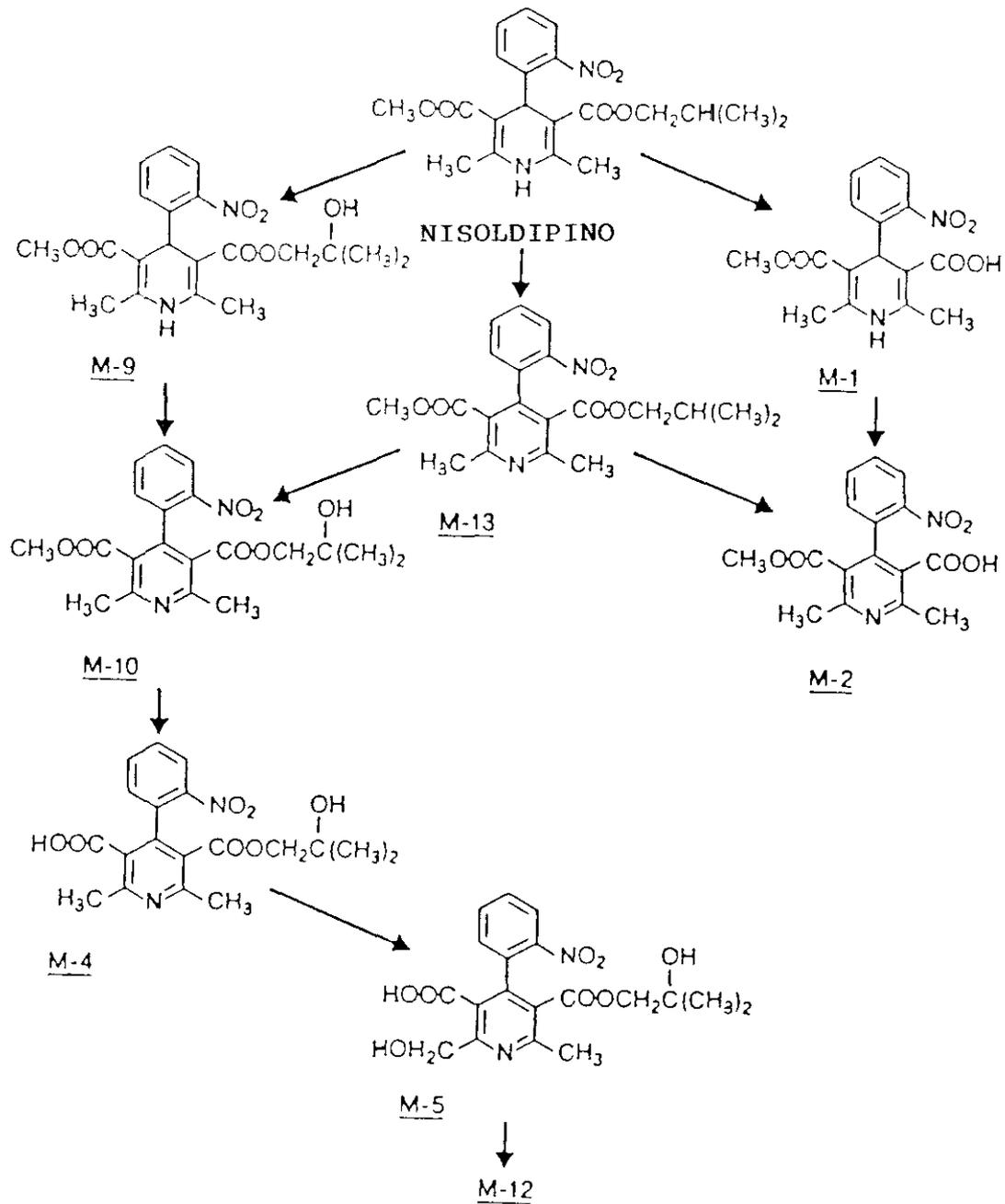


FIGURA 13: Ruta metabólica de NS y sus principales metabolitos.

El carácter lipofílico de estas moléculas les confiere una relativa facilidad a la hora de atravesar barreras orgánicas; especial mención requiere la facilidad y rapidez con las que el Nimodipino atraviesa la Barrera Hemato-Encefálica (B.H.E.), debido probablemente, a una mayor lipofilia que el resto de sus compañeros de grupo (VAN DER KERKHOFF y DREWES, 1989), lo que hace que tenga una proyección clínica diferente que al resto de las dihidropiridinas.

En la Tabla 2, se resumen las principales características farmacocinéticas de las dihidropiridinas antagonistas del Ca^{++} utilizadas en la realización de esta Tesis Doctoral.

En orina humana no se detectan dihidropiridinas en forma activa, o si se detectan, es en cantidades despreciables (MEYER et al. 1983a,b; RÄMSCH et al. 1986; AHR et al. 1987; SCHERLING et al. 1987). La cantidad de fármaco, o mejor, de sus metabolitos que aparecen en orina, varía para cada dihidropiridina; así la eliminación urinaria de Nisoldipino o sus metabolitos se realiza en un 70% (SCHERLING et al. 1987; AHR y KUHLMAN, 1988), el Nifedipino en un 50% (KLEINBLOESEM et al. 1984), el Nitrendipino en un 30% (KANN et al. 1984) y el Nimodipino en 15% (BUEHNER y RÄMSCH, 1984).

La eliminación de fármaco en forma activa o sus

metabolitos por heces o bilis, salvo para el Nisoldipino, es mayor que la urinaria en todos los casos.

I.5.5.2.- CARACTERISTICAS FARMACODINAMICAS.

Este aspecto ya se ha expuesto, aunque de manera general en el apartado I.5.4.. No obstante, debido a que existen ciertas diferencias en el comportamiento farmacodinámico de estos compuestos, se añadirán algunos matices de importancia.

El Ca^{++} es un catión divalente que interviene en multitud de procesos celulares vitales, aunque, tal vez, uno de sus papeles más importantes se produce en las células musculares (cardíacas, lisas vasculares, lisas no vasculares). Las dihidropiridinas se unen a lugares de alta afinidad en éstos y otros tejidos para ejercer su acción antagonista del Ca^{++} (FLECKENSTEIN, 1977; BELLEMAN et al. 1981; EHLERT et al. 1982). Sin embargo la relación entre la unión de las dihidropiridinas al canal y el bloqueo de éstos, aún no está claro.

En tejidos como corazón y cerebro, no se conocen bien los efectos de las bajas concentraciones de dihidropiridinas en la función fisiológica, aunque se sabe que existen zonas con gran densidad de lugares de unión de alta afinidad

(JANIS y SCRIBINE, 1983; MILLER y FREEDMAN, 1984).

Por otra parte se sabe que la cantidad de dihidropiridina necesaria para bloquear el canal es de 100 a 1000 veces mayor que la que hace falta para que se produzca el acoplamiento del compuesto a su punto de unión (KASS, 1982; LEE y TSIEN, 1983). ¿Es que la unión a los lugares de alta afinidad y el bloqueo del canal no están relacionados? (BEAN 1984).

La eficacia clínica de las dihidropiridinas con actividad antagonista del Ca^{++} (sobre todo Nifedipino, Nimodipino y Nitrendipino) se basa en que inhiben selectivamente las contracciones del músculo liso (vascular) sin afectar de forma apreciable la capacidad contráctil del músculo cardíaco (BEAN et al. 1987), a pesar de que en ambos tipos musculares existen gran densidad de lugares de alta afinidad y los canales de Ca^{++} son de características similares.

La explicación, podría ser, que las dihidropiridinas (sobre todo Nifedipino y Nitrendipino), sólo actúan a concentraciones bajas sobre canales de Ca^{++} VOC tipo L (lentos) que parecen presentar diferentes subtipos en función del tejido donde se encuentren (BEAN et al. 1987). Los canales de Ca^{++} tipo T, también serían sensibles a la acción de las dihidropiridinas, pero a concentraciones de fármaco mucho más elevadas (BEAN et al. 1987).

Por otra parte, ya se ha descrito en esta Tesis Doctoral, que el canal de Ca^{++} puede encontrarse en tres estados diferentes: Reposo (R), Activado (A) e Inactivado (I) (SANGUINETTI y KASS, 1984) y algunos autores han demostrado que el estado en el que se encuentre el canal depende del potencial (voltaje) de membrana celular (BEAN et al. 1987; KASS et al. 1987), de tal forma que el canal se encuentra en estado (I) cuando la célula se encuentra depolarizada (KASS et al. 1987).

La hipótesis del receptor modulado (HILLE, 1977; HONDEGHEM y KATZUNG, 1977), propuesta para explicar el bloqueo de los canales de Na^+ por los anestésicos locales, sugiere que los fármacos que bloquean la conducción de un canal determinado actúan sobre diferentes estados del canal, los cuales son voltaje-dependientes.

Apoyándose en esta hipótesis se ha propuesto que las dihidropiridinas tienen una especial afinidad por los canales de Ca^{++} tipo VOC-L en estado (I) (BEAN et al. 1987; KASS et al. 1987). El que en el músculo liso vascular en reposo, una gran fracción de los canales se encuentre en estado (I) (susceptibles de una gran potencia de bloqueo), mientras que en tejido cardíaco se encuentren en estado (R) (baja afinidad para el acoplamiento con dihidropiridinas), podría explicar por qué con las dihidropiridinas predomina

el efecto vascular sobre el cardíaco (BEAN et al. 1987).

Otra explicación, puede ser, que las dihidropiridinas tardan un tiempo (varios minutos) en unirse al canal. En el ciclo de los canales de Ca^{++} en el músculo cardíaco, el tiempo que se encuentra el canal en estado (I) es de 200-600 mseg. por lo que las dihidropiridinas no tienen tiempo material de unirse a él (BEAN et al. 1987).

Esta carencia de efecto directo sobre tejido cardíaco y potente efecto vascular, hace que las dihidropiridinas (sobre todo Nifedipino, Nitrendipino y Nisoldipino) se utilicen preferentemente en el tratamiento de Hipertensión arterial, Angina de pecho, Infarto de miocardio, Insuficiencia Cardíaca y Alteraciones Vasculares Periféricas (Fenómeno de RAYNAUD) entre otros.

El Nimodipino, tiene acciones preferentemente cerebro-vasculares (KAZDA y TOWART, 1982) así como neuro y psicofarmacológicas (HOFFMEISTER et al. 1982). Como no existen puntos de unión exclusivos para Nimodipino en cerebro, sino que también existen para otros antagonistas del Ca^{++} , incluso no dihidropiridínicos (FERRY et al. 1984), la explicación para su efecto a nivel del SNC viene dada porque el Nimodipino atraviesa la B.H.E. con mucha mayor facilidad que sus compañeros de grupo farmacológico, debido a que es,

con mucho, la molécula más lipofílica (VAN DER KERCKHOFF y DREWES, 1989).

Al ejercer su acción fundamentalmente, pero no exclusivamente sobre sistema vasculo-cerebral y también neuronal, el Nimodipino se indica fundamentalmente en procesos neurológicos que cursen con isquemia y/o hipoxia (sobre todo Hemorragia Subaracnoidea), Migrañas y también en algunas enfermedades cardíacas (tratamiento de apoyo en la resucitación tras Fibrilación Ventricular).

I.6.- FARMACOS AGONISTAS DEL Ca^{++}

SCHRAM et al. (1983b) describieron que pequeñas variaciones llevadas a cabo en la molécula de Nifedipino originan otra dihidropiridina con efecto diametralmente opuesto al de los antagonistas del Ca^{++} (Fig. 14), tanto sobre músculo cardíaco (efecto inotrópico (+)) como sobre músculo liso (contracción muscular). Estos efectos son inhibidos competitivamente por Nifedipino (SCHRAM et al. 1983b, KULLAK et al. 1987; BOURSON et al. 1989).

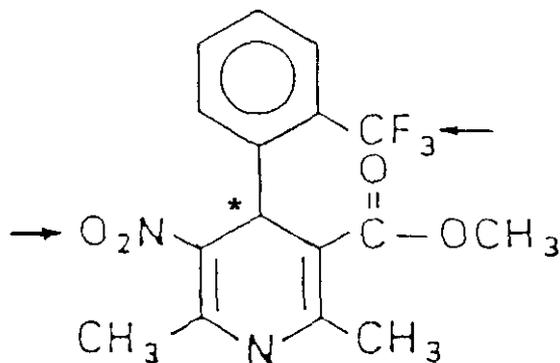
Uno de los compuestos más representativos de estos fármacos agonistas del Ca^{++} es el metil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3-nitro-4-(2-trifluorometilfenil)-piridina-5-carboxilato (BAY K 8644) (Fig. 14).

I.6.1.- BAY K 8644

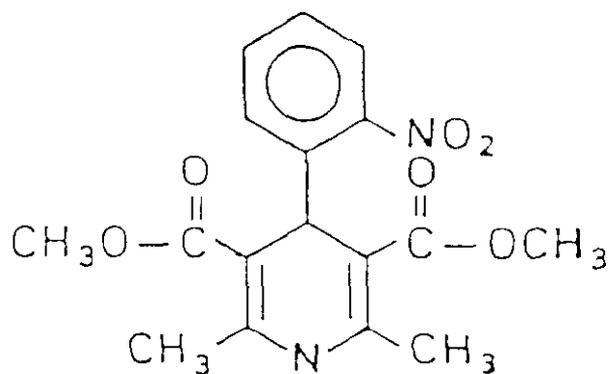
I.6.1.1.- ESTRUCTURA QUIMICA

El BAY K 8644 es un fármaco agonista de los canales de Ca^{++} que se obtiene tras la sustitución en el anillo aromático de la molécula de Nifedipino de un grupo CF_3 por uno NO_2 y de un NO_2 en posición 3 del anillo de las dihidropiridinas, en vez del grupo ester del Nifedipino (Fig. 14). Sólo esta última modificación parece ser esencial para conferir la propiedad agonista del Ca^{++} a esta nueva molécula así formada (GODFRAIND et al. 1986).

El BAY K 8644, presenta un carbono asimétrico en posición 4 del anillo de las dihidropiridinas (Fig. 14), lo que implica la existencia de 2 enantiómeros. El enantiómero (+) ha demostrado tener efectos antagonistas del Ca^{++} similares cualitativamente, a los de Nifedipino o Nimodipino (SCHRAMM et al. 1985) mientras que el enantiómero (-) es un agonista del Ca^{++} con efectos farmacológicos en músculo vascular y cardíaco que son cualitativamente comparables pero cuantitativamente más potentes que la mezcla racémica (SCHRAMM et al. 1985; FRANCKOWIAK et al. 1985).



BAY K 8644



NIFEDIPINO

FIGURA 14

Estructura química del BAY K 8644. Comparación con la estructura química de NF. Las flechas indican los radicales que varían en la molécula de BAY K 8644. * = Carbono asimétrico.

I.6.1.2.- EFECTOS DEL BAY K 8644

El BAY K 8644 fue descrito en principio como un fármaco vasoconstrictor y con actividad inotropa (+) (SCHRAM et al. 1983a,b), pero posteriormente se ha demostrado que también tiene actividad sobre otros tipos celulares; así BROWN et al. (1984) describieron que el BAY K 8644 incrementa la corriente de Ca^{++} en las neuronas hipocámpales; NOWYCKY et al. (1985), utilizando la técnica de "patch clamp" en raíz ganglionar dorsal del pollo, observaron que este fármaco incrementaba la corriente de entrada de Ca^{++} a través de los canales de tipo L, aunque este efecto no se producía en los canales tipo T o N.

CEÑA et al. (1985) estudiaron los efectos del BAY K 8644 en conducto deferente de rata pretratado con $|^3H|N$ A viendo que no aumentaba la corriente de Ca^{++} provocada por Tiramina, pero sí lo hacía con la corriente de Ca^{++} originada por la depolarización inducida por K^+ o por estímulo eléctrico; por otra parte, estos mismos autores sugieren que el BAY K 8644 actúa a nivel de canales de Ca^{++} presinápticos modulados por receptores α_2 -adrenérgicos.

También se han descrito los efectos del BAY K 8644 sobre células de otras estructuras orgánicas, como médula adrenal (CEÑA et al. 1983); células yuxtaglomerulares (MAY

y PEART, 1985); páncreas (MALAISSE-LAGAE et al. 1984; MALAISSE et al. 1985) y corteza cerebral (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985).

Además de este amplio bagaje experimental realizado "in vitro", también hay estudios en los que se han obtenido alteraciones comportamentales en animales de experimentación a los que se administró BAY K 8644 "in vivo".

Al administrar BAY K 8644 a ratones por vía intraperitoneal (i.p.) los efectos comportamentales fundamentales fueron: ataxia, hipoactividad psicomotora, convulsiones y erección de la cola (BOLGER et al. 1985), PETERSEN (1986) refiere un síndrome "seudo espástico" que aparecía en ratas tras la administración i.p. de BAY K 8644.

BOURSON et al. (1989) en trabajos realizados en rata, utilizando dos vías de administración diferentes: i.p. e intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) y diferentes dosis de fármaco describieron que el BAY K 8644 administrado i.p. a dosis entre 0,5-4 mg/kg provocaba un incremento en la presión arterial, disminución de la actividad locomotora y de la actividad refleja, contractura muscular y cambios posturales, entre otros efectos; mientras que la administración i.c.v. a dosis entre 5 y 20 µg/kg provocaba la aparición de cambios posturales y de hipoactividad motora. Además los

mismos autores estudiaron paralelamente las concentraciones de monoaminas en corteza cerebral y núcleo estriado de las ratas previamente tratadas con BAY K 8644 observando fundamentalmente un incremento significativo de las concentraciones de Ac. Homovanillico y de Ac. 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC).

Los resultados referidos por BOURSON y su equipo coincidían, o reafirmaban, resultados similares obtenidos por otros autores (SCHRAMM et al. 1983a,b; BOLGER et al. 1985; ILDEFONSE et al. 1985; PETERSEN, 1986).

La administración de BAY K 8644, prolonga, por otra parte, el tiempo de latencia en el test de analgesia realizado en la cola de rata (BERGE et al. 1988; BOURSON et al. 1989), aunque estos resultados se han explicado por su efecto vasoconstrictor.

Trabajos realizados por HOFFMEISTER y TETTENBORN (1986) describen la existencia de un doble efecto (efecto bifásico) dosis-dependiente del BAY K 8644, de tal forma que la administración de este fármaco a ratones a dosis de 100 µg/kg i.v. potencia la acción del fentanilo (agonista µ), mientras que dosis más bajas (1-10 µg/kg) disminuían estos efectos.

Asimismo describen que la administración de BAY K 8644 0,1-100 µg/kg i.v. no produce alteraciones en el umbral de percepción de dolor en la rata; sin embargo, dosis de 1 y 10 mg/kg v.o. provoca un alargamiento en el tiempo de latencia al realizar el test de la placa caliente en ratones.

Se sabe que los efectos agonistas del Ca^{++} del BAY K 8644 son dosis-dependientes, siendo más evidentes a dosis bajas (10^{-9} - 10^{-7} mol/l) y van disminuyendo al aumentar la dosis (HOFFMEISTER y TETTENBORN, 1986). Por otra parte, se han descrito efectos antagonistas en preparaciones aisladas de corazón, a elevadas concentraciones, caracterizadas por efecto inotrope (-) (VAGHY et al. 1984a,b; SCHRAM et al. 1985).

I.6.1.3.- MECANISMO DE ACCION DEL BAY K 8644.

Parece claro que el BAY K 8644 actúa a dos niveles bien diferenciados: periférico y central (BOURSON et al. 1989).

Actúa en el mismo lugar que actúan las otras dihidropiridinas (canales de Ca^{++} tipo VOC) (GLOSSMAN et al. 1983b; SARMIENTO et al. 1984b) y compite con ellas por el punto de unión (BELLEMAN, 1984; SARMIENTO et al. 1984b; DONO

SO y HUIDOBRO, 1986; KULLAK et al. 1987). Esto explicaría por qué el BAY K 8644 antagoniza los efectos producidos por el Nifedipino (SPEDDING y BERG, 1984; KULLAK et al. 1987), antagoniza con menos potencia la acción del Verapamilo y Diltiazem (SPEDDING y BERG, 1984; SPEDDING, 1985 ya que estos fármacos no actúan en el mismo lugar que las dihidropiridinas, pero lo regulan de manera alostérica, positivamente (Diltiazem) (DE POVER et al. 1982; FERRY y GLOSSMAN, 1982; YAMAMURA et al. 1982) o negativamente (Verapamilo) (BELLEMAN et al. 1983; GOULD et al. 1983; MURPHY et al. 1983) y no tiene ningún efecto sobre la acción de las difenilpiperacinas (SPEDDING y BERG, 1984).

En resumen, se puede concluir que:

- El BAY K 8644 es una sustancia que favorece el paso de Ca^{++} al interior celular a través de los canales lentos de Ca^{++} .
- Que tiene dos tipos de efectos (central y periférico).
- Que actúa en el mismo lugar de unión que las dihidropiridinas, con las que interacciona de manera competitiva.
- Que tiene interacción de tipo no competitivo con Verapamilo y Diltiazem.
- No tiene ningún tipo de interacción con los antagonistas del Ca^{++} de la familia de las difenilpiperacinas.
- Tiene un efecto bifásico (agonista-antagonista) que parece ser dependiente de la dosis y de la forma química utilizada.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar y comparar el mecanismo de acción de cinco dihidropiridinas (Nifedipino, Nisoldipino, Nitrendipino, Nimodipino y BAY K 8644).

Utilizamos para ello:

- La preparación fibra longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobayo, valorando las modificaciones que estos fármacos produjeron en la respuesta contráctil de esta preparación inducida por diferentes tipos de estímulo (estímulo eléctrico, Ach o ClK).
- Diferentes estructuras de Sistema Nervioso Central (S.N.C.) de rata, evaluando las variaciones en los niveles de Serotonina y Noradrenalina y el metabolito de la Serotonina, Ac. 5-hidroxi-indolacético.
- Estudio "in vivo" de las modificaciones provocadas por estos fármacos sobre algunos parámetros del comportamiento de la rata.

MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

III.1.- PREPARACION DE LA SOLUCION KREBS.

Para la realización de los experimentos se ha utilizado solución de Krebs, según las modificaciones de HENSELEIT (KREBS y HENSELEIT, 1932).

La solución de Krebs se preparó del siguiente modo:

Se toma un matraz aforado de 1000 c.c. de capacidad y se vierten en él:

- 2 g de glucosa
- 2 g de bicarbonato
- 84 c.c. de solución madre
- Agua destilada hasta enrasar 1000 c.c.

Se agita hasta obtener una solución homogénea que queda así constituida:

	Concentración mM
- Sodio -----	143.3
- Potasio -----	5.9
- Calcio -----	2.7
- Magnesio -----	1.2
- Cloro -----	128.3
- Fosfato -----	2.2
- Bicarbonato -----	24.9
- Sulfato -----	1.2
- Glucosa -----	11.0

Asimismo, también se utilizó para la realización de algunas series de experimentos solución de Krebs hiper-cálcica; ésta se consiguió agregando 2.70 ml de Cloruro de Calcio valorado al 10% para obtener una concentración final de calcio de 5.4 mM.

III.2.- PREPARACION FIBRA LONGITUDINAL-PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

III.2.1.- AISLAMIENTO DE LA PREPARACION FIBRA LONGITUDINAL-PLEXO MIENTERICO.

Se utilizaron cobayos de ambos sexos, con un peso comprendido entre 250-300 g, que han permanecido en ayunas durante un periodo de 24 h previo a su sacrificio.

Se sacrifican mediante un golpe en la cabeza y posterior sección del paquete vasculo-nervioso del cuello y columna vertebral.

Se accede a la masa intestinal por disección de la piel y de la musculatura de la pared anterior del abdomen. Se indentifica el ileon y se extrae un segmento de una logitud aproximada de 30 cm., despreciándose los 10 cm. más distales (unión ileo-cecal) por poseer una gran cantidad de receptores alfa-adrenérgicos excitadores (MUNRO 1953).

La porción de ileon así obtenida se conserva en un vaso de precipitados que contiene solución Krebs a temperatura ambiente. Se toman cortes de aproximadamente 5 cm. de longitud de los que se separa el mesenterio mediante disección con tijera. A partir de estos segmentos intestinales se consigue la preparación FL-PM, según la modificación de la técnica descrita por AMBACHE en 1954, para aislar fibras longitudinales del ileon de conejo.

Mediante una pipeta fina se intuba uno de dichos segmentos fijándolo con un hilo por uno de sus extremos. Posteriormente se practican dos cortes superficiales, uno transversal, próximo al extremo atado, y otro longitudinal, a lo largo de la línea de unión del mesenterio. Ambos cortes realizados sirven para seccionar la capa de fibras musculares longitudinales dejando indemnes las fibras musculares circulares.

Para separar los bordes se utiliza una torunda de algodón empapada en solución Krebs y se levanta el borde del corte transversal, lo suficiente como para poder atar un hilo en el extremo de la fibra y poder traccionar para separar la fibra completa (Fig. 15).

Aproximadamente a 2,5-3 cm. del hilo de tracción, se ata un segundo hilo desprejiendo el resto de la fibra despegada. Nos queda así, una porción de aproximadamente

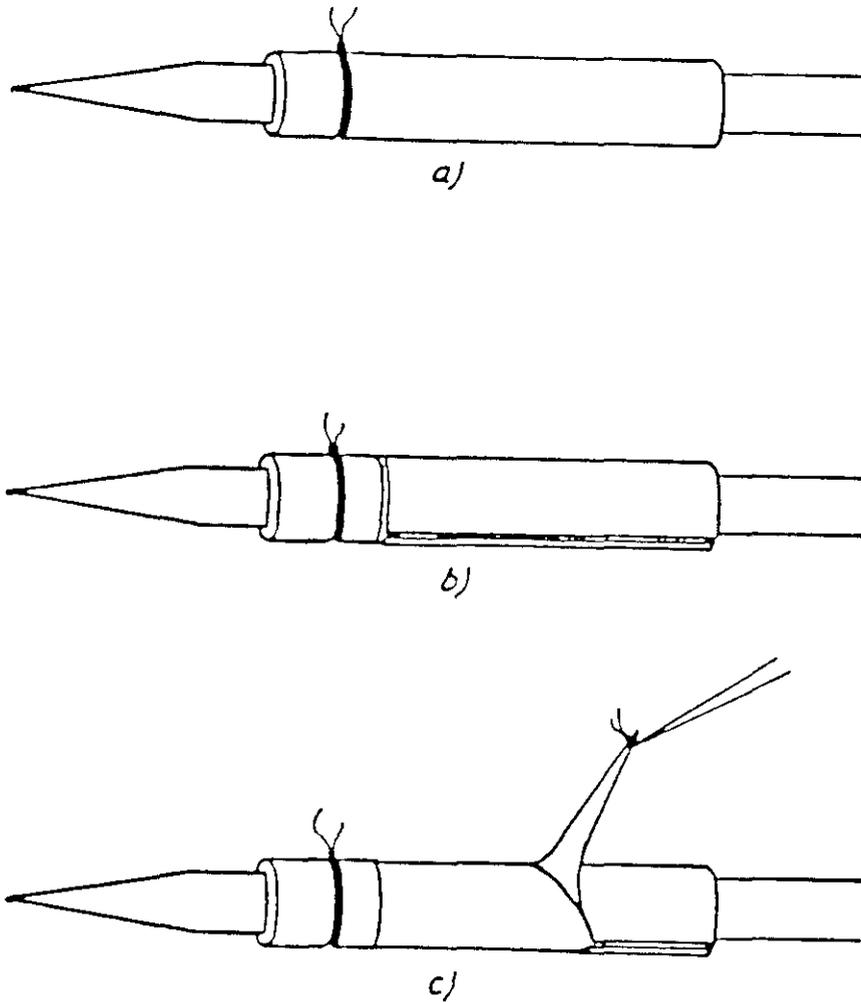


FIGURA 15

Fases del aislamiento de las fibras longitudinales-Plexo de Auerbach de ileon de cobayo.

a) Intestino intubado.

b) Corte longitudinal y transversal.

c) Separación de las fibras por tracción.

2,5 cm. de longitud de preparación FL-PM fijada a ambos extremos por sendos hilos.

Es imprescindible mantener la preparación humedecida con solución Krebs durante todo el proceso.

III.2.2.- MONTAJE DE LA PREPARACION FIBRA LONGITUDINAL-PLEXO MIENTERICO.

Para el montaje de la preparación se ha utilizado un baño de órganos en el que se instala una copa con capacidad para 40 ml. que se llena de solución Krebs, se burbujea con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y se mantiene a la temperatura constante de 34° C.

Para la estimulación eléctrica de la preparación se utilizan dos electrodos de platino en forma de anillo. Las tiras de la preparación se fijan por un extremo al anillo inferior y se pasan por el interior del anillo superior fijando el extremo libre a un transductor isométrico. A continuación se confiere a la preparación la tensión de 1 g.

Para estimular la preparación se emplea un estimulador GRASS SD-9, que libera ondas cuadradas de las siguientes características: voltaje supramaximal, frecuencia de 0,3 Hz. y duración de 2 milisegundos.

Las contracciones se registran en un polígrafo OMNISCRIIBE serie D 5000 de dos canales a través de un transductor isométrico (Fig. 16).

III.3.- DETERMINACION DE MONOAMINAS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.

III.3.1.- AISLAMIENTO Y EXTRACCION DE LAS ESTRUCTURAS.

Se utilizaron ratas SPRAGUE-DAWLEY de ambos sexos entre 200-300 g. de peso. Se sacrificaron mediante decapitación extrayéndose las siguientes estructuras pertenecientes al S.N.C.:

- Estructuras intracraneales:

Se practica craneotomía y se extrae la masa encefálica en bloque, disecando con pinza roma:

- Bulbo
- Mesencéfalo
- Corteza Cerebral
- Hipocampo.

- Estructura extracraneal:

Se practica sección de la columna vertebral a nivel lumbo-sacro. Se visualiza canal medular. Se canula con aguja roma y se inyecta suero fisiológico a presión en sentido caudo-craneal hasta conseguir la herniación de la médula espinal por el otro extremo de la columna vertebral

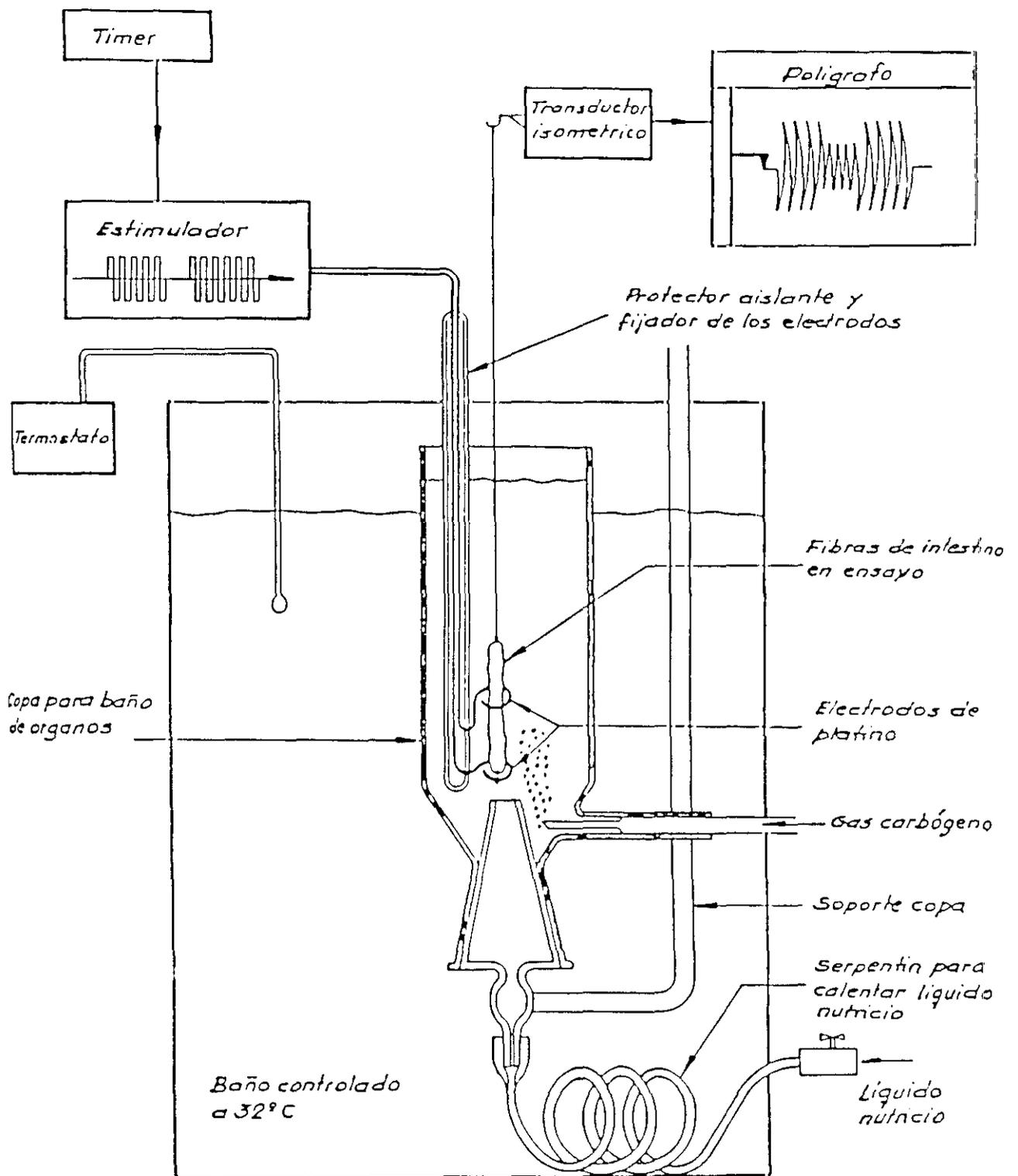


FIGURA 16

Esquema de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico montada en baño de órganos.

(unión cérvico-dorsal).

III.3.2.- MANIPULACION DE LAS ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.

Una vez extraídas las estructuras procedentes del S.N.C. de rata, tanto las intracraneales como la médula fueron congeladas a -80° C en un congelador REVCO, manteniéndose en este estado hasta el momento de ser pesadas en una balanza de precisión METTLER H 64.

Posteriormente las estructuras se depositan en un tubo de polietileno donde se agregan 4 volúmenes de ácido perclórico 0,4 M y metabisulfito sódico 0,1% procediéndose a continuación a su homogeneización mediante un homogeneizador de émbolo HEIDOLPH.

Una vez homogeneizadas, las estructuras se transfieren a tubos de policarbonato que se centrifugan en una centrífugadora CENTRIKON T-2080 a $43000 \times g$, durante 25 minutos y a temperatura constante de 4° C. Después se toman alícuotas de 20 μ l del sobrenadante, que son inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) con detector electroquímico donde, se cuantifica el contenido de neurotransmisores que existen en la muestra. Se cuantificaron Noradrenalina, Serotonina y el metabolito principal

de la Serotonina (Ac. 5-Hidroxi-indol-acético).

El HPLC está constituido por:

- Inyector WATERS
- Bomba WATERS 510
- Columna WATERS RESOLVE C18
- Detector electroquímico WATERS 460
- Integrador-registrador WATERS 745

Las condiciones de la separación cromatográfica fueron comunes a todos ellos: Flujo 1 ml/min, diferencia de potencial entre electrodo de referencia y el de trabajo de 0.79 V. e intensidad de corriente de 20 nA.

La fase móvil estaba formada por un tampón fosfato/citrato y metanol. Se modificaron los tiempos de retención de los compuestos, mediante la variación de porcentaje de metanol, pequeñas variaciones de pH y adición de ácido 1-octanosulfónico.

Las fases móviles utilizadas fueron:

- Para detección de Serotonina y Ac. 5-Hidroxi-indol-acético:
 - Fosfato disódico 0,1 M
 - Acido cítrico 0,1 M
 - Metanol 10 V/V
 - pH 4

- Para detección de Noradrenalina:
- Fosfato disódico 0,1 M
- Acido cítrico 0,1 M
- Metanol 10 V/V
- Ac. 1 Octanosulfónico 1,8 mM
- pH 4

III.4.- FARMACOS UTILIZADOS

- Acetilcolina (Sigma).
 - Cloruro Potásico (Merck).
 - Nitrendipino.
 - Nisoldipino.
 - Nimodipino.
 - Nifedipino.
 - BAY-K 8644
- } (Química Farmacéutica Bayer)

III.4.1.- DILUCION DE LOS FARMACOS.

Se prepararon soluciones madre para almacenar de cada uno de los fármacos utilizados con las siguientes características:

- Acetilcolina: Solución madre 10^{-4} M en agua bidestilada.
Almacenamiento refrigerado.
- Cloruro Potásico: Solución madre 1 M en agua bidestilada.
Almacenamiento refrigerado.

- Nitrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nifedipino y BAY-K 8644: Solución madre 10^{-2} en etanol, y las sucesivas disoluciones en agua bidestilada.

Almacenamiento refrigerado.

Se comprobó que el etanol a las concentraciones finales administradas en el baño no producía ningún tipo de alteración en la motilidad de las preparaciones FL-PM de ileon de cobayo. En el caso de la administración de fármacos "in vivo" (Nitrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nifedipino y BAY-K 8644) las soluciones fueron preparadas en el momento de inyectarlas, teniendo el vehículo utilizado para la inyección la siguiente composición y proporciones:

- Etanol 15%
- Propilenglicol 15%
- Agua bidestilada 70%

Cuando se utilizaron fármacos sensibles a la luz, como ocurre con las dihidropiridinas, éstos fueron protegidos de la misma, trabajando, en este caso, con luz procedente de lámpara de sodio con una longitud de onda superior a 450 nm.

Se comprobó que el disolvente utilizado en las soluciones de dihidropiridinas no producía alteración alguna en el comportamiento de los animales tratados ni en la

detección de aminas en las estructuras del S.N.C. de la rata.

III.5.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados expresan la media \pm el error estándar de la media (E.S.M.).

La significación estadística de los resultados se calculó mediante los siguientes tests:

- t de Student en preparaciones FL-PM de ileon de cobayos.
- Análisis de varianza seguido del test de DUNCAN en estructuras de SNC de rata.

Consideramos significativa la de diferencia para valores de $p < 0,05$.

III.6.- METODOLOGIA GENERAL

III.6.1.- PREPARACION FIBRA LONGITUDINAL-PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

III.6.1.1.- Contracciones inducidas por estímulo eléctrico.

Se estudió en esta preparación, la capacidad de obtener una respuesta contráctil mediante estimulación eléctrica.

Las condiciones de estimulación fueron, voltaje supramaximal, frecuencia de 0,3 Hz. y duración 2 milisegundos.

Previamente a la aplicación del estímulo las preparaciones se dejaron relajar durante un tiempo de 15-20 minutos; el tiempo de estimulación fue de 120 minutos, comprobando que la intensidad de la contracción provocada por el estímulo eléctrico era estable a lo largo de este periodo de tiempo.

III.6.1.2.- Contracción provocada por Acetilcolina exógena.

Se estudiaron las respuestas obtenidas en estas preparaciones tras la administración de Ach a la dosis necesaria para alcanzar en el baño de órganos una concentración constante de 1 μ M; se deshecharon todas las preparaciones cuya respuesta contráctil fue menor de 1/2 g.

Una vez administrado el fármaco el tiempo de contacto de éste con la preparación fue de 2 minutos retirándose el mismo en todos los casos mediante lavado con solución Krebs. Esta operación se repitió cada 15 minutos hasta comprobar que la respuesta contráctil era estable y homogénea.

Previamente a la administración del fármaco las preparaciones se dejaron relajar durante un tiempo de 15-20 minutos.

La altura de la contracción se midió en el momento de la máxima fuerza para la parte fásica (rápida) y en la zona más estable para la tónica (lenta).

III.6.1.3.- Contracción provocada por Cloruro de Potasio.

Se estudiaron las respuestas obtenidas en esta preparación tras la administración de ClK a la dosis necesaria para alcanzar una concentración constante en el baño de órganos de 50 mM; se deshecharon todas las preparaciones cuya respuesta contráctil fue menor de 1/2 g.

Una vez administrado el fármaco el tiempo de contacto de éste con la preparación fue de 2 minutos, retirándose el mismo, en todos los casos mediante lavado con solución Krebs. Esta operación se repitió cada 15 minutos hasta comprobar que la respuesta contráctil era estable y homogénea.

Previamente a la administración del fármaco, las preparaciones se dejaron relajar durante un tiempo de 15-20 minutos.

La altura de la contracción se midió en el momento de máxima fuerza para la parte fásica (rápida) y en la zona más estable para la tónica (lenta).

III.6.1.4.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico.

Se comenzaron los experimentos realizando curvas dosis-respuesta para todos los fármacos utilizados pertenecientes al grupo de las dihidropiridinas utilizando las siguientes concentraciones (nM) en baño:

- Nifedipino: 25, 50, 100, 200.
- Nimodipino: 25, 50, 100, 200.
- Nitrendipino: 25, 50, 100, 200.
- Nisoldipino: 10, 20, 40, 80.
- BAY-K 8644: 70, 150, 300, 600, 800, 1000, 1200 y 1500.

Previamente a la administración de la primera dosis, las preparaciones se dejaron relajar durante un tiempo de 15-20 minutos. Las dosis de cada fármaco se administraron de manera acumulativa, permaneciendo la concentración constante en el baño de órganos un tiempo de 15 minutos.

Los experimentos se midieron en todos los casos

en el momento de máximo efecto (máximo incremento o máxima inhibición) para cada dosis de cada fármaco.

Esta fase preliminar se realizó con el fin de utilizar posteriormente la dosis de fármaco más cercana a la que producía el 50% del efecto máximo.

Todas las curvas dosis-respuesta se realizaron utilizando como líquido nutritivo solución Krebs normocálcica (Ca^{++} , 2,7 mM).

III.6.1.5.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por Acetilcolina.

Se estudiaron los efectos producidos por las dihidropiridinas sobre la contracción provocada por Ach en la preparación FL-PM de ileon de cobayo a las siguientes concentraciones (nM) en baño que oscilaron para los diferentes fármacos utilizados:

- Nifedipino: 25 - 200.
- Nimodipino: 25 - 200.
- Nitrendipino: 25 - 200.
- Nisoldipino: 10 - 80.
- BAY-K 8644: 70 - 1500.

Se administró Ach en la forma descrita en el apartado III.6.1.2. hasta conseguir una respuesta contráctil

homogénea y estable; una vez en este punto, y después de lavar la preparación con solución Krebs, se agregó al baño de órganos la dosis correspondiente del fármaco en estudio, manteniéndose ésta en contacto con la preparación durante 15 minutos, tras los que, y sin lavado previo, se añadió una última dosis de Ach.

El estudio de los efectos de las dihidropiridinas sobre la contracción provocada por Ach exógena se realizó en dos grupos, uno utilizando solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2.7 mM) y otro utilizando solución Krebs hipercálcica (Ca^{++} 5.4 mM).

III.6.1.6.- Efecto de las dihidropiridinas estudiadas sobre la respuesta contráctil inducida por Cloruro Potásico.

Se estudiaron los efectos provocados por las dihidropiridinas sobre la contracción producida por CLK en la preparación FL-PM de ileon de cobayo a las siguientes concentraciones (nM) en baño que oscilaron para los diferentes fármacos utilizados:

- Nifedipino: 25 - 200.
- Nimodipino: 25 - 200.
- Nitrendipino: 25 - 200.
- Nisoldipino: 10 - 80.
- BAY-K 8644: 70 - 1500.

Se administró ClK en la forma descrita en el apartado III.6.1.3. hasta conseguir una respuesta contráctil homogénea y estable; una vez en este punto, y después de lavar la preparación con solución Krebs, se agregó al baño de órganos la dosis correspondiente del fármaco en estudio, manteniéndose ésta en contacto con la preparación durante un tiempo de 15 minutos, tras el que, y sin lavado previo, se añadió la última dosis de ClK.

El estudio de los efectos de las dihidropiridinas sobre la contracción provocada por ClK se realizó en dos grupos uno utilizando solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) y otro utilizando solución Krebs hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM).

III.6.2.- ESTRUCTURAS PROCEDENTES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.

III.6.2.1.- Ratas control.

Se utilizaron ratas SPRAGUE-DAWLEY de ambos sexos entre 200-300 g. de peso de las que se extrajeron, según la técnica descrita, las estructuras intracraneales y la médula espinal.

Se cuantificaron los niveles de Serotonina, Noradrenalina y Ac. 5-Hidroxi-indolacético en cada una de las estructuras extraídas.

III.6.2.2.- Ratas tratadas con dihidropiridinas.

Se utilizaron ratas SPRAGUE-DAWLEY de ambos sexos entre 200-300 g. de peso, a las que se les administró el fármaco mediante inyección intraperitoneal (i.p.).

Todos los fármacos utilizados fueron pertenecientes al grupo de las dihidropiridinas, y las dosis utilizadas para cada uno de ellos, las siguientes:

- Nifedipino: 10 mg/kg.
- Nimodipino: 10 mg/kg.
- Nitrendipino: 10 mg/kg
- Nisoldipino: 5 mg/kg.
- BAY-K 8644: 0,2 mg/kg y 2 mg/kg.

Una vez inyectado el fármaco, el animal era aislado en un cajón acondicionado a tal efecto, con unas medidas de 50 x 25 x 25 cm y 15 minutos después de la inyección comenzaba una observación minuciosa de su comportamiento (actividad exploradora, tono muscular, aparición de movimientos estereotipados, etc..) durante 45 minutos. Acabada ésta, el animal era sacrificado mediante decapitación, extrayéndosele las estructuras intracraneales y la médula espinal, cuantificándose los niveles de Serotonina, Noradrenalina y Ac. 5-Hidroxiindolacético.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1.- EXPERIENCIAS REALIZADAS EN PREPARACION FIBRA LONGI- TUDINAL-PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

IV.1.1- EFECTO DE LAS DIHIDROPIRIDINAS ANTAGONISTAS DEL Ca^{++} Y DEL BAY K 8644 SOBRE LA CONTRACCION INDU- CIDA POR ESTIMULO ELECTRICO.

- Solución Krebs normocálcica.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} a concentraciones entre 25-200 nM, para Nifedipino (NF), Nimodipino (NM) y Nitrendipino (NT), y entre 10-80 nM para Nisoldipino (NS), produjeron una inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil inducida por E.E. (Fig. 17).

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, la inhibición producida por NS fue más marcada que la del resto de DHP antagonistas del Ca^{++} investigadas.

La DHP con propiedad agonista del Ca^{++} , BAY K 8644 a concentraciones entre 70-600 nM, provocó un incremento en la respuesta contráctil de estas preparaciones que se relacionó con la dosis de manera inversamente proporcional. La dosis más alta investigada (600 nM), no sólo no

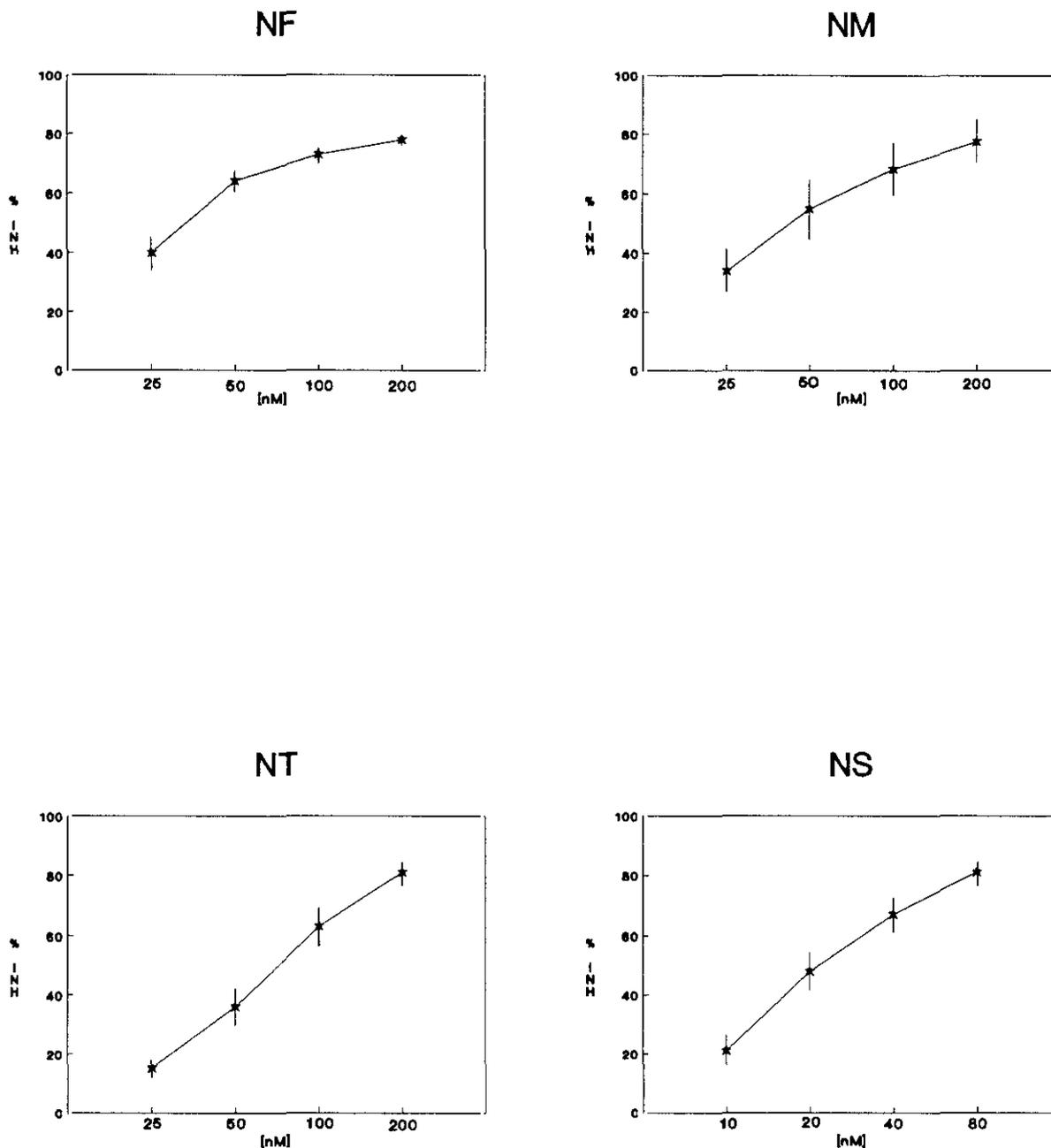


FIGURA 17

Inhibición de la respuesta contráctil de la preparación FL-PM de ileon de cobayo provocada por E.E. en presencia de NF, NM, NT y NS.

En el eje de las ordenadas se representa el % de inhibición de la respuesta contráctil máxima. En el eje de abscisas se representa la concentración utilizada de cada fármaco. Cada punto representa la media (\pm ESM) de al menos siete preparaciones diferentes.

incrementó la intensidad de la respuesta contráctil provocada por E.E., sino que su efecto era debilmente inhibitorio. El máximo incremento se consiguió con la más baja de las dosis utilizadas (70 nM). (Fig. 18).

- Solución Krebs hipercálcica.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), se mostraron significativamente menos eficaces para inhibir la respuesta contráctil inducida por E.E. en presencia de Ca^{++} 5,4 mM, que en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM).

NM demostró tener una potencia inhibitoria significativamente menor que el resto, cuando se trabajó en solución Krebs hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las DHP restantes (NF, NT, NS) (Fig. 19).

El BAY K 8644, a concentraciones entre 70-1500 nM, produjo un incremento de la respuesta contráctil provocada por E.E., que fue más marcada a la concentración 300 nM, observándose una disminución de dicho incremento a la dosis más alta utilizada (1500 nM). (Fig. 18).

BAY K 8644

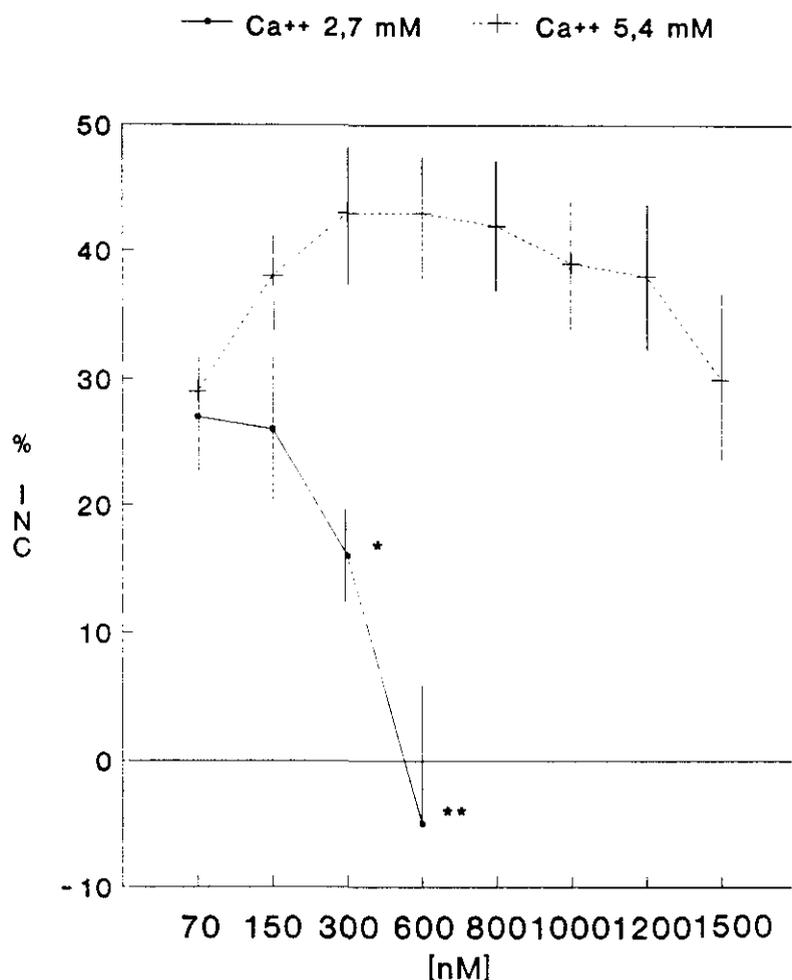


FIGURA 18

Variación en la respuesta contráctil de la preparación FL-PM de ileon de cobayo provocada por E.E. incubada en solución Krebs normocálcica (Ca⁺⁺ 2,7 mM) e hipercálcica (Ca⁺⁺ 5,4 mM), y en presencia de BAY K 8644.

En el eje de ordenadas se representa el % de incremento de la respuesta contráctil máxima. En el eje de abscisas se representa la concentración de fármaco utilizada. Cada punto representa la media + ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

*p < 0,05; **p < 0,01.

EFFECTO DE DHP PARA DIFERENTE [Ca⁺⁺]

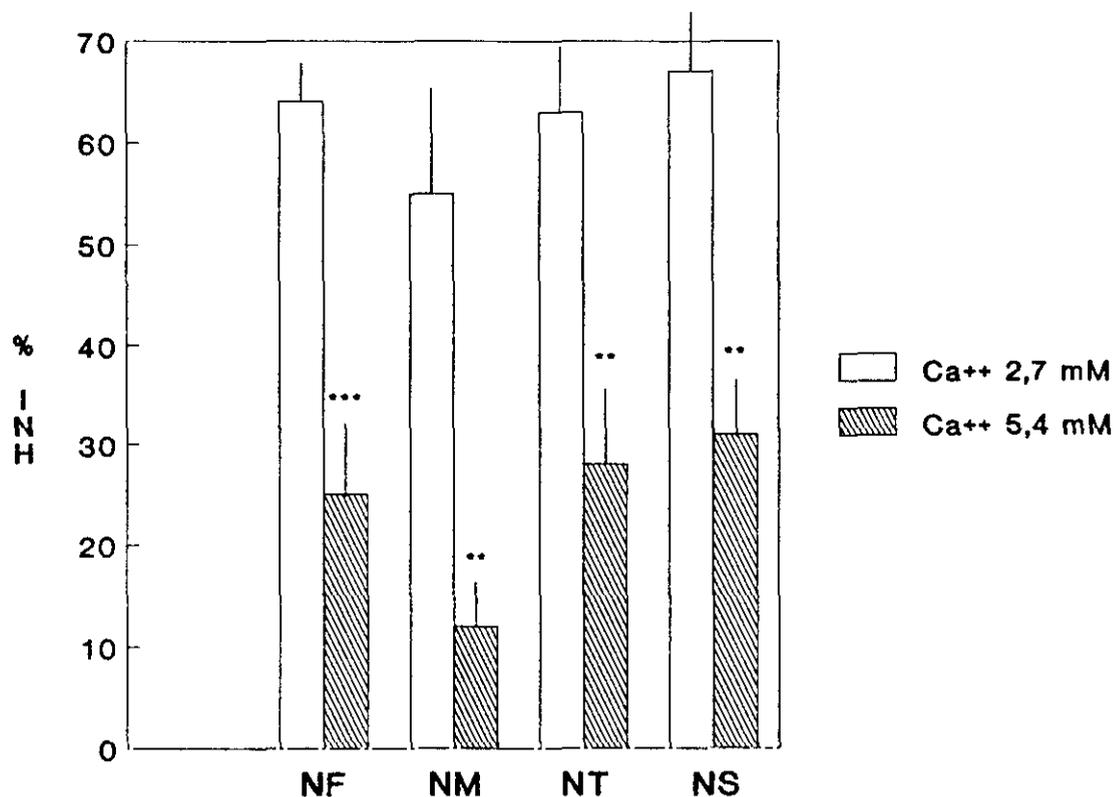


FIGURA 19

Comparación del efecto inhibitorio provocado por NF (50 nM), NM (50 nM), NT (100 nM) y NS (40 nM), sobre la respuesta contráctil provocada por E.E. en la preparación FL-PM de ileon de cobayo incubadas en solución Krebs normocálcica (Ca⁺⁺ 2,7 mM) e hipercálcica (Ca⁺⁺ 5,4 mM). En el eje de ordenadas se representa el % de inhibición de la respuesta contráctil. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

p < 0,01; *p < 0,001.

IV.1.2.- EFECTO DE LAS DIHIDROPIRIDINAS ANTAGONISTAS DEL Ca^{++}
Y DEL BAY K 8644 SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR
ACETILCOLINA.

- Solución Krebs Normocálcica.

* Componente Fásico.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} a concentraciones entre 25-200 nM para NF, NM, NT y entre 10-80 nM para NS, produjeron una inhibición dosis-dependiente del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach (1 μ M). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto máximo producido por NF, NM, NT y NS, aunque NS fue más potente que el del resto de las DHP investigadas (Fig. 20).

El BAY K 8644 demostró tener efecto diferente en función de la concentración utilizada; así a la concentración de 70 nM, provocó un incremento del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach, mientras que la concentración mayor (600 nM), produjo, por el contrario, una inhibición moderada del mismo (Fig. 21).

* Componente Tónico.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM), NM (50 nM), NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron una inhibición del 100% sobre el componente tónico de la respuesta contráctil.

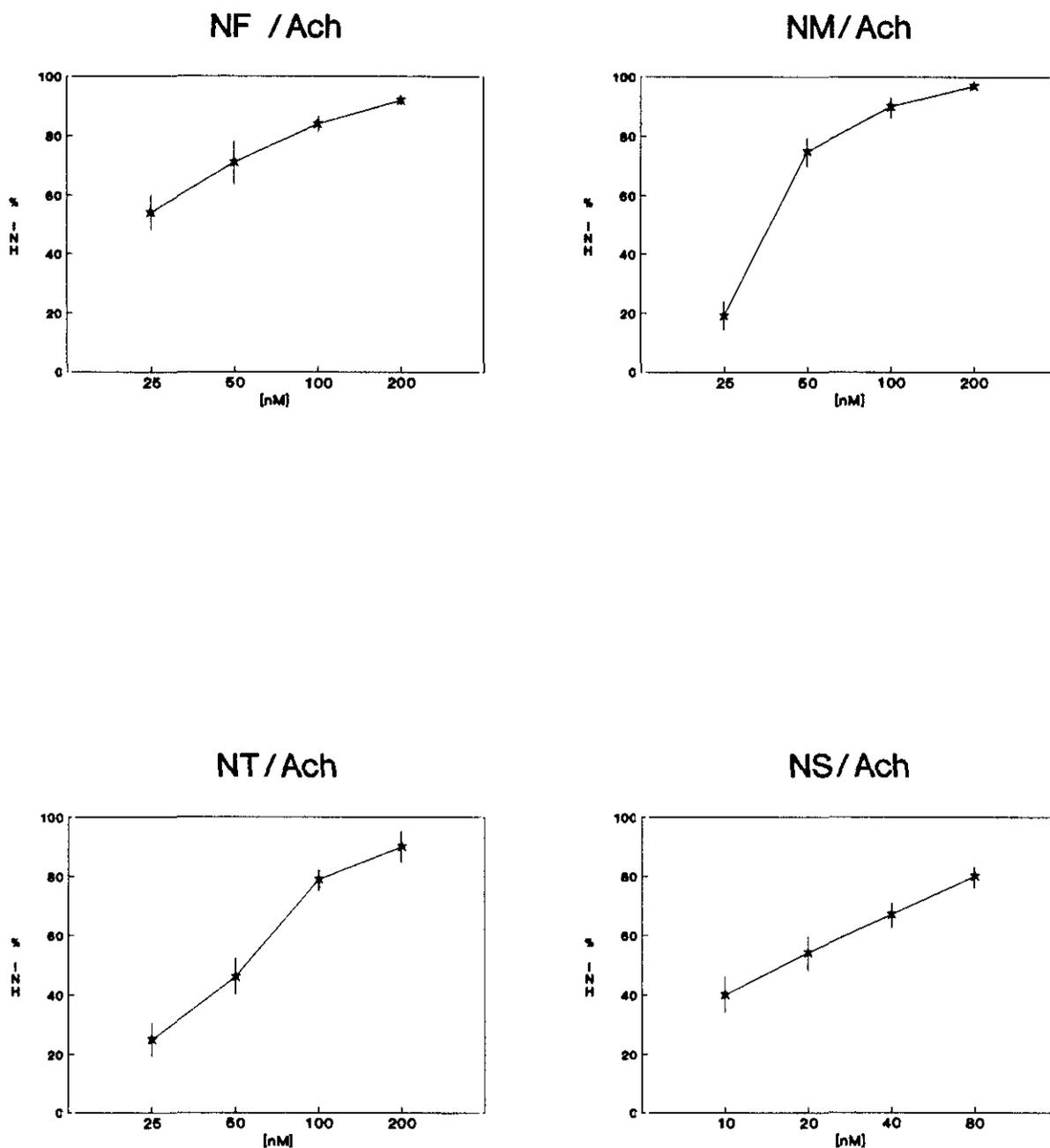


FIGURA 20

Efecto de NF, NM, NT y NS sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ACh ($1 \mu\text{M}$) en la preparación FL-PM de ileon de cobayo. En el eje de ordenadas se representa el % de inhibición de la respuesta contráctil máxima. En el eje de abscisas, las concentraciones del fármaco utilizado. Cada punto representa la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

BAY K 8644

Ach CONTRACCION FASICA (Ca⁺⁺ 2,7 mM)

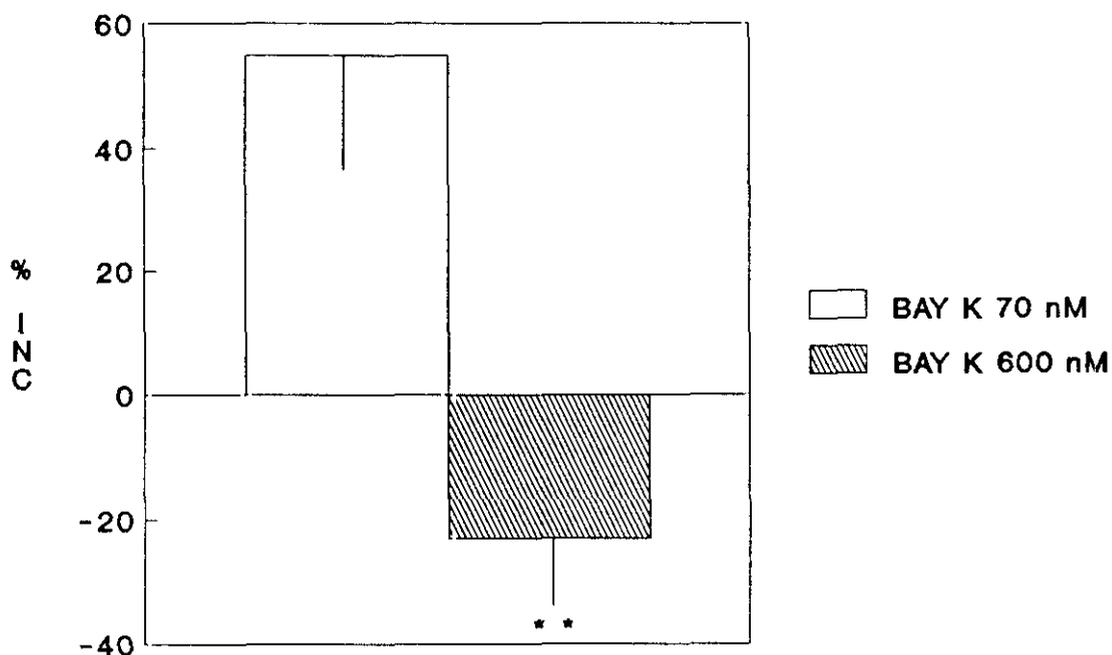


FIGURA 21

Efecto provocado por el BAY K 8644 a las concentraciones de 70 y 600 nM sobre el componente fásico de la respuesta contráctil provocada por Ach (1 μ M), en preparación FL-PM de ileon de cobayo incubada en solución KREBS normocálcica (Ca⁺⁺ 2,7 mM). En el eje de ordenadas se representa el % de incremento de la respuesta contráctil. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

**p < 0,01.

til provocada por Ach.

El BAY K 8644 utilizado a concentraciones de 70 nM y 600 nM, produjo inhibición del componente tónico de la contracción. Esta fue más marcada ($-58\% \pm 4.98$) a la concentración máxima utilizada (600 nM).

- Solución Krebs hipercálcica.

* Componente Fásico.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron inhibición del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach (1 μM), menos marcada en preparaciones incubadas y montadas en solución Krebs hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM), que la que se observa en preparaciones incubadas y montadas en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) (Tabla 3). La diferencia fue estadísticamente significativa para NM y NT.

El BAY K 8644 utilizado a concentraciones entre 70 nM y 600 nM, produjo, en ambos casos, un incremento del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach (1 μM). El incremento obtenido fue más marcado a la concentración 70 nM que con la de 600 nM; aunque la diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa. (Fig. 22).

TABLA 3

Efecto provocado por NF, NM, NT y NS sobre el componente fásico de la contracción inducida por Ach (1 μ M) en la preparación FL-PM de ileon de cobayo incubada en solución KREBS normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) o hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM).

FARMACO Y DOSIS	[Ca^{++}]	COMPONENTE FASICO DE LA CONTRACCION. % DE INHIBICION
NF 50 nM	2,7 mM	71 \pm 7,3
	5,4 mM	60 \pm 5,3
NM 50 nM	2,7 mM	75 \pm 4,9
	5,4 mM	53 \pm 6.3*
NT 100 nM	2,7 mM	79 \pm 5,3
	5,4 mM	38 \pm 1,7***
NS 40 nM	2,7 mM	67 \pm 4,3
	5,4 mM	70 \pm 3,8

Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 7 preparaciones diferentes.

*p < 0,05; ***p < 0,001.

BAY K 8644

Ach CONTRACCION FASICA (Ca⁺⁺ 5,4 mM)

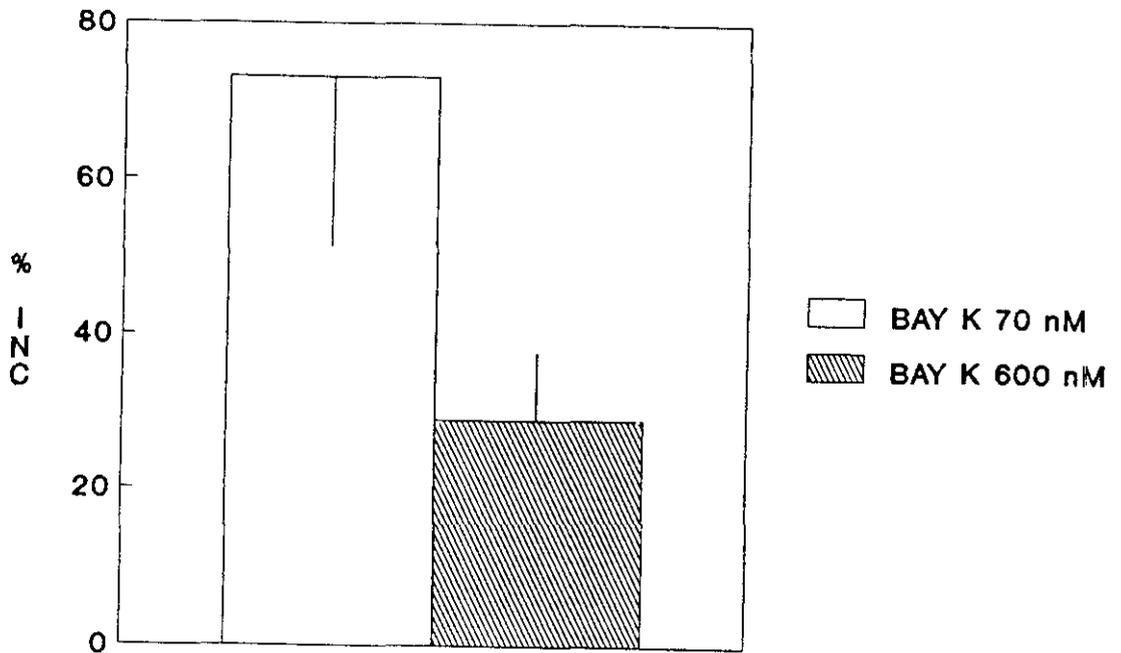


FIGURA 22

Efecto provocado por BAY K 8644 a las concentraciones de 70 y 600 nM sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach ($1 \mu\text{M}$), en preparación FL-PM de ileon de cobayo incubada en solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM). En el eje de ordenadas se representa el % de incremento de la respuesta contráctil. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

El BAY K 8644 incrementó de manera más eficaz el componente fásico de la contracción, cuando las preparaciones fueron incubadas y montadas en solución Krebs hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM), que cuando lo fueron en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) (Figs. 21 y 22).

*** Componente Tónico.**

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron inhibición del componente tónico de la contracción inducida por Ach. Dicha inhibición fue menos marcada que la obtenida cuando las preparaciones se incubaron y montaron en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) (inhibición del 100%). (Fig. 23).

El BAY K 8644 se utilizó a las concentraciones entre 70 nM y 1500 nM, registrándose, con la concentración más baja un incremento del componente tónico de la respuesta contráctil ($49\% \pm 15,7$). La concentración mayor (1500 nM), produce, por el contrario, un incremento poco marcado de dicho componente ($5\% \pm 10,8$).

NORMOCALCICO (Ca^{++} 2,7 mM)

HIPERCALCICO (Ca^{++} 5,4 mM)

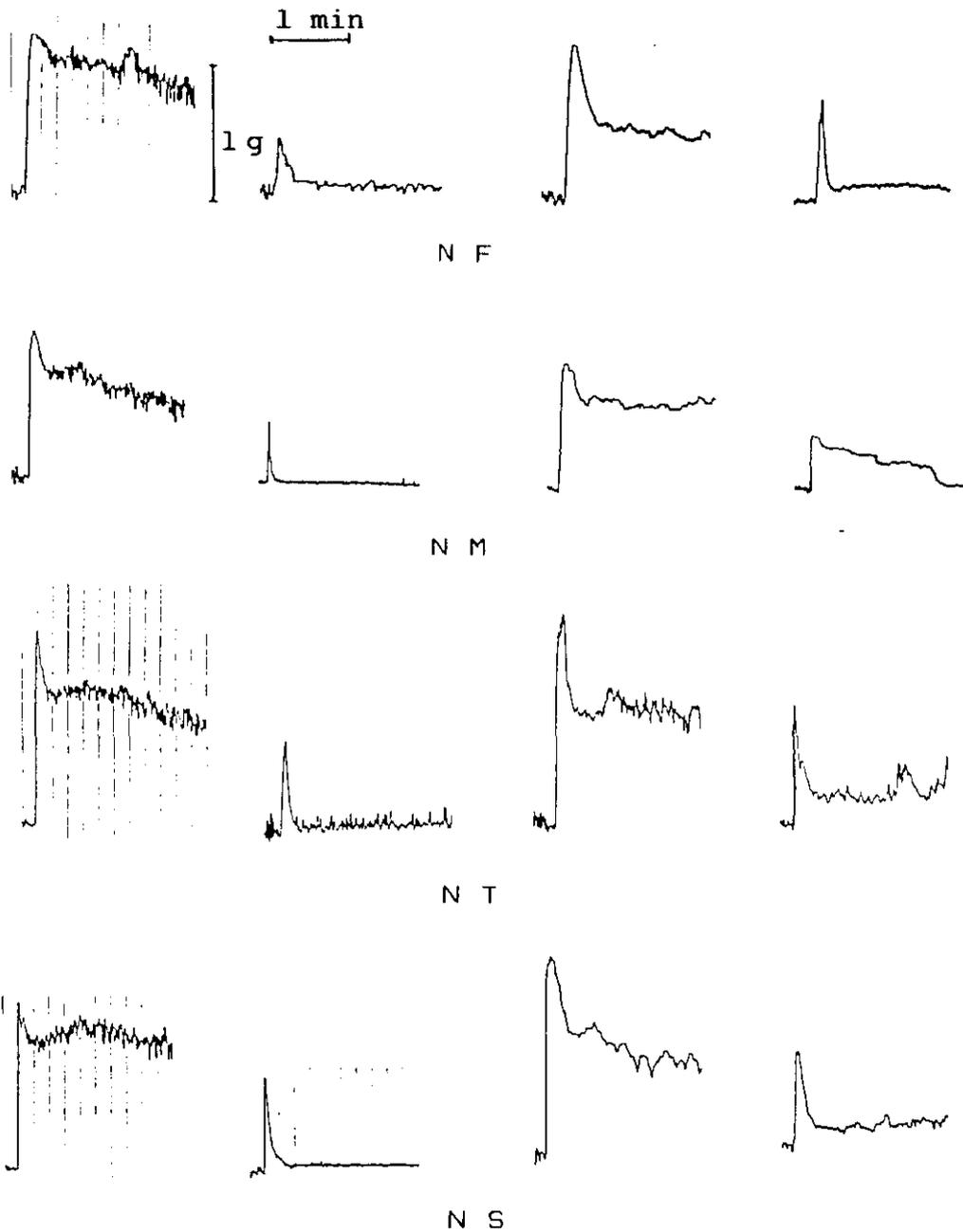


FIGURA 23

Efecto de NF (50 nM), NM (50 nM), NT (100 nM) y NS (40 nM) sobre la respuesta contráctil inducida por Ach (1 μM) en preparación FL-PM de ileon de cobayo incubadas en solución KREBS normo e hipercálcica (2.7 mM y 5.4 mM).

IV.1.3.- EFECTO DE LAS DIHIDROPIRIDINAS ANTAGONISTAS DEL Ca^{++} Y DEL BAY K 8644 SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR CLORURO DE POTASIO.

- Solución Krebs Normocálcica

* Componente Fásico.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} a concentraciones entre 25-200 nM para NF, NM y NT y entre 10-80 nM para NS, produjeron una inhibición dosis-dependiente del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM). (Fig. 24). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto máximo, aunque NS demostró ser la más potente.

La inhibición producida por las DHP antagonistas del Ca^{++} fue menor cuando la contracción se indujo con ClK (50 mM), que cuando se indujo con Ach (1 μM). (Fig. 25).

El BAY K 8644 utilizado a concentraciones de 70 nM y 600 nM, produjo un incremento del componente fásico de la contracción inducida por ClK. Dicho incremento fue mayor para la concentración máxima utilizada (600 nM), aunque la diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa (Fig. 26).

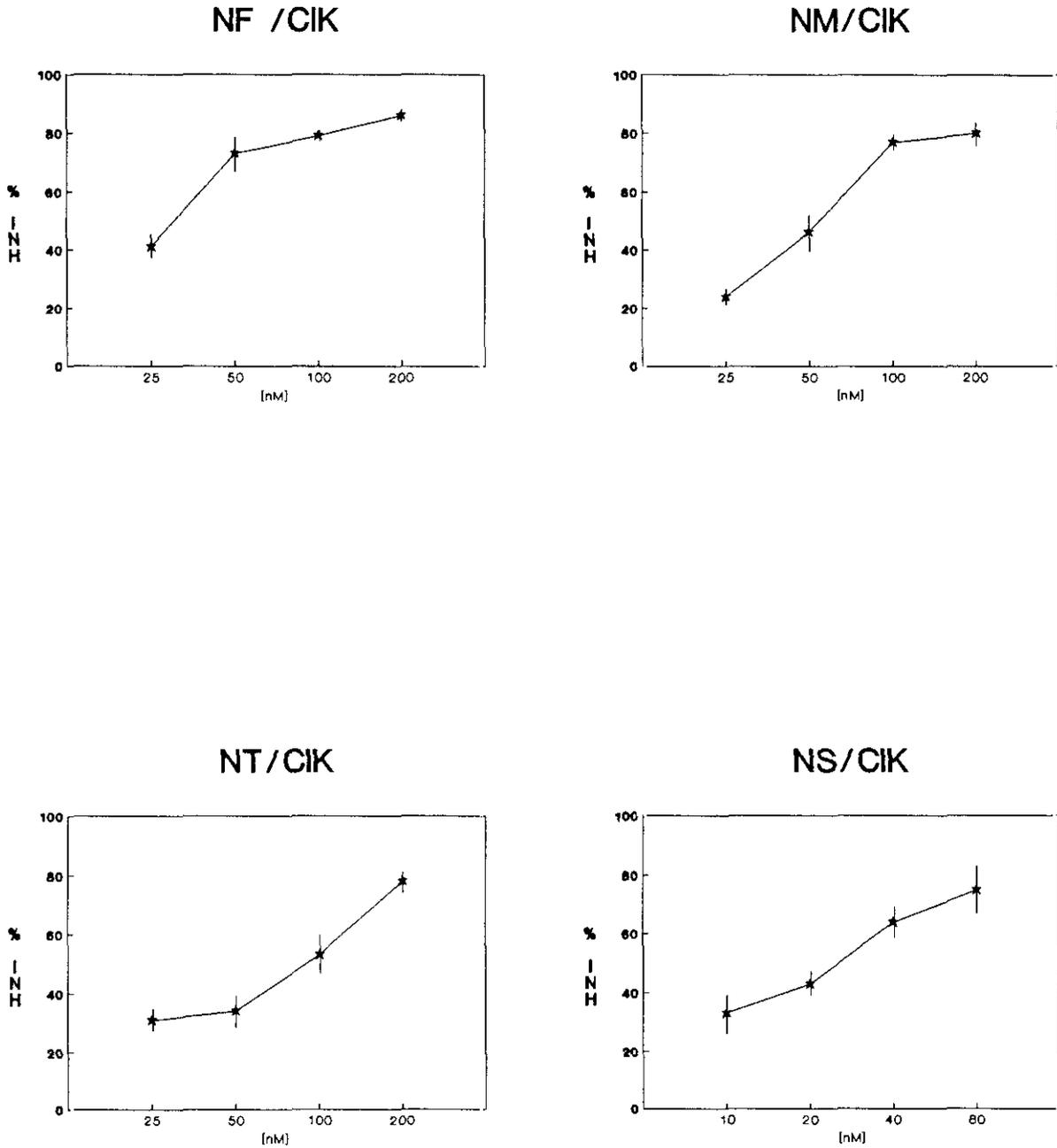


FIGURA 24

Inhibición del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM) en la preparación FL-PM de ileon de cobayo en presencia de NF, NM, NT y NS. En el eje de ordenadas se representa el % de inhibición de la respuesta máxima. En el eje de abscisas se representa la concentración de fármaco utilizada. Cada punto representa la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

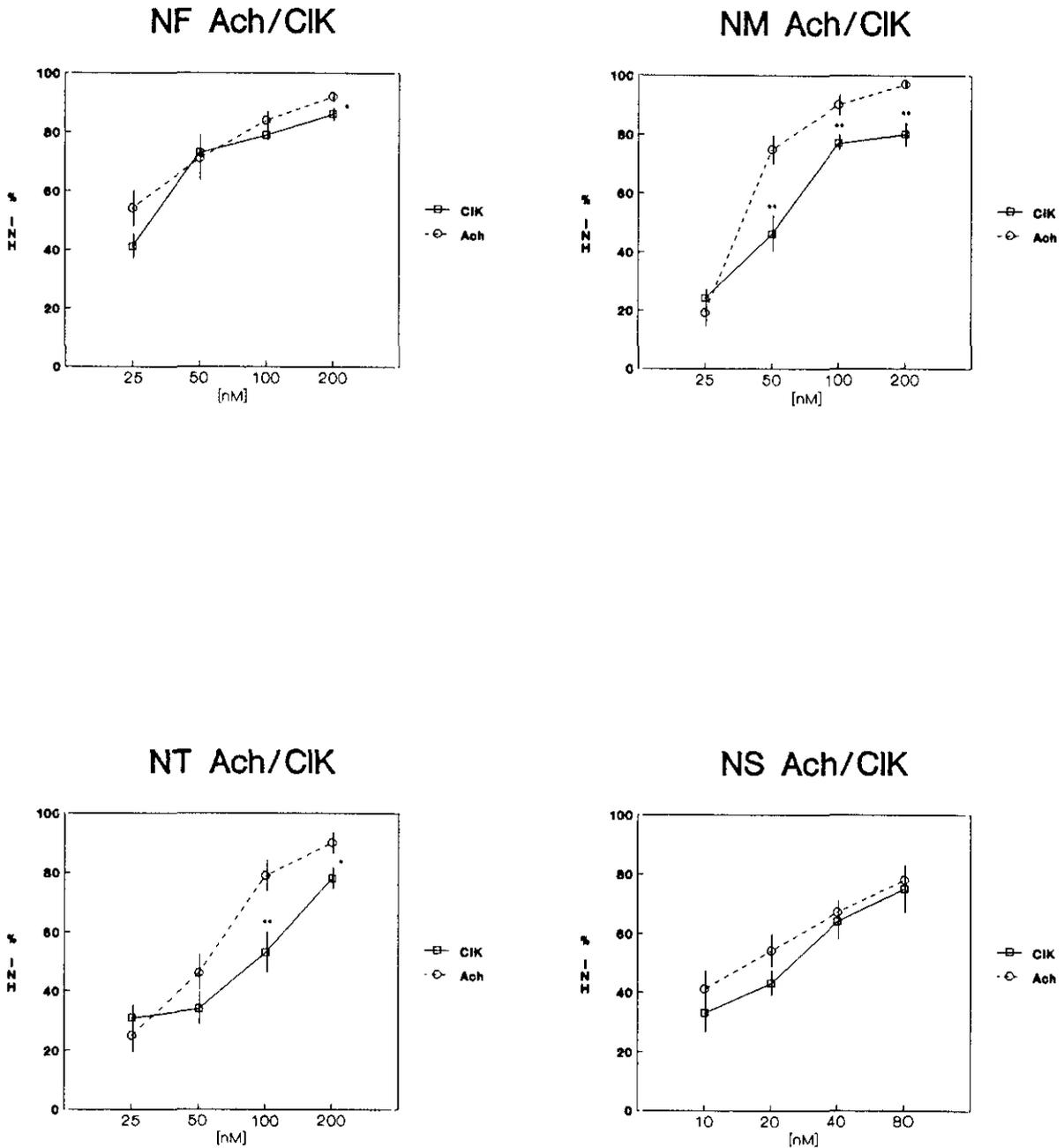


FIGURA 25

Comparación entre la inhibición del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM), y el inducido por Ach (1 μ M), en presencia de NF, NM, NT y NS. En el eje de ordenadas se representa el % de inhibición de la respuesta contráctil máxima. En el de abscisas la concentración de fármaco utilizada. Cada punto representa la media + ESM de al menos siete preparaciones diferentes. *p < 0,05; **p < 0,01.

BAY K 8644

CIK CONTRACCION FASICA (Ca⁺⁺ 2,7 mM)

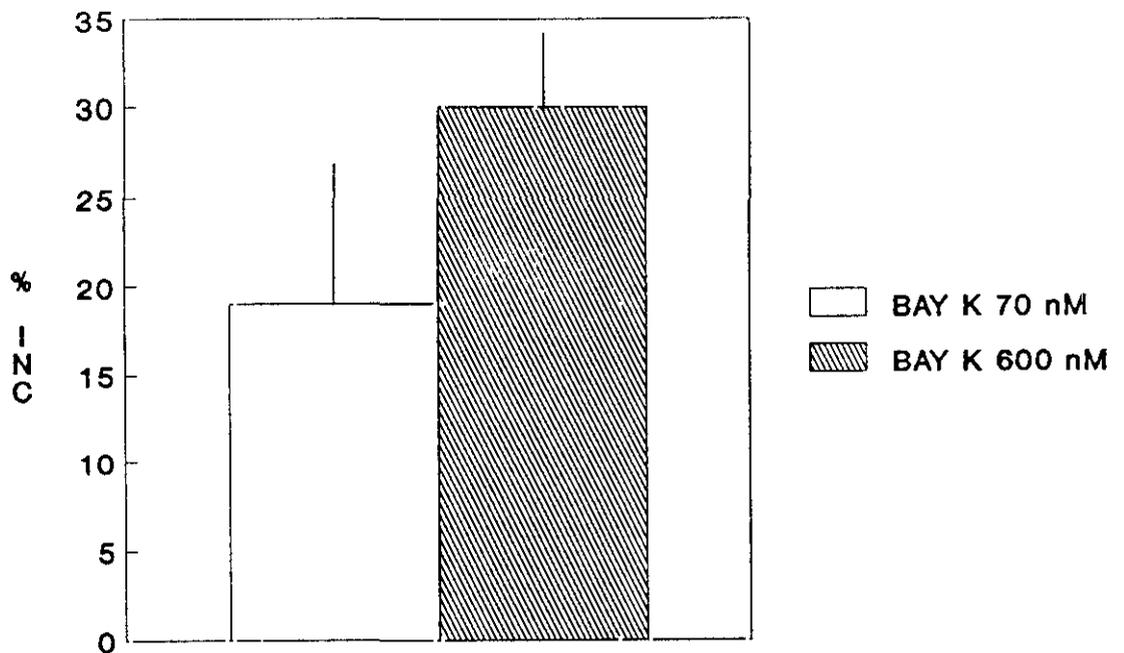


FIGURA 26

Efecto del BAY K 8644 a las concentraciones de 70 y 600 nM, sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM) en la preparación FL-PM de ileon de cobayo, incubada en solución KREBS normocálcica (Ca⁺⁺ 2,7 mM). En el eje de ordenadas se representa el % de incremento de la respuesta contráctil. Cada valor representa la media ± ESM de al menos siete preparaciones diferentes.

*** Componente Tónico.**

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron una inhibición del componente tónico de la respuesta contráctil provocada por CLK (50 mM) del 100%.

El BAY K 8644, utilizado a la concentración de 70 nM, produjo un incremento del componente tónico de la contracción ($35\% \pm 16.5$). A la concentración de 600 nM; se observó un efecto moderadamente inhibitorio ($15\% \pm 6.8$). La diferencia entre ambos fue estadísticamente significativa, $p < 0,05$.

- Solución Krebs Hipercálcica

*** Componente Fásico.**

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron una inhibición del componente fásico de la respuesta contráctil inducida por CLK (50 mM). Esta inhibición fue menos marcada que la observada en preparaciones incubadas y montadas en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM). Encontrándose diferencias estadísticamente significativas para el efecto producido por NS y NF. (Tabla 4).

TABLA 4

Efecto provocado por NF, NM, NT y NS sobre el componente fásico de la contracción inducida por ClK (50 mM) en la preparación FL-PM de ileon de cobayo incubada en solución KREBS normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM) o hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM).

FARMACO Y DOSIS	[Ca^{++}]	COMPONENTE FASICO DE LA CONTRACCION. % DE INHIBICION
NF 50 nM	2,7 nM	72,5 ± 6
	5,4 nM	42 ± 7,3**
NM 50 nM	2,7 nM	46,3 ± 6,3
	5,4 nM	43 ± 7,4
NT 100 nM	2,7 nM	52,8 ± 6,9
	5,4 nM	37,4 ± 7
NS 40 nM	2,7 nM	64,3 ± 5,5
	5,4 nM	39,5 ± 3,1**

Cada valor representa la media ± ESM de al menos 7 preparaciones diferentes. **p < 0,01.

El BAY K 8644, empleado a las concentraciones de 70 nM y 1500 nM produjo un incremento en el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM). Este incremento fue mayor ($32\% \pm 7,6$) para la concentración máxima empleada (1500 nM), siendo la diferencia entre ambas estadísticamente significativa. (Fig. 27).

Este efecto del BAY K 8644, fue similar al obtenido cuando las preparaciones se incubaron y montaron en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM). (Figs. 26 y 27).

* Componente Tónico.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF (50 nM); NM (50 nM); NT (100 nM) y NS (40 nM), produjeron una inhibición del 100% en el componente tónico de la contracción inducida por ClK (50 mM). Este efecto fue similar al obtenido cuando las preparaciones se incubaron y montaron en solución Krebs normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM).

El BAY K 8644 utilizado a la concentración de 70 nM produjo una inhibición del componente tónico de la respuesta contráctil ($8\% \pm 5,8$), que fue más marcada que la que se obtuvo con la dosis mayor, 1500 nM, ($3\% \pm 11$). La diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa.

BAY K 8644

ClK CONTRACCION FASICA (Ca⁺⁺ 5,4 mM)

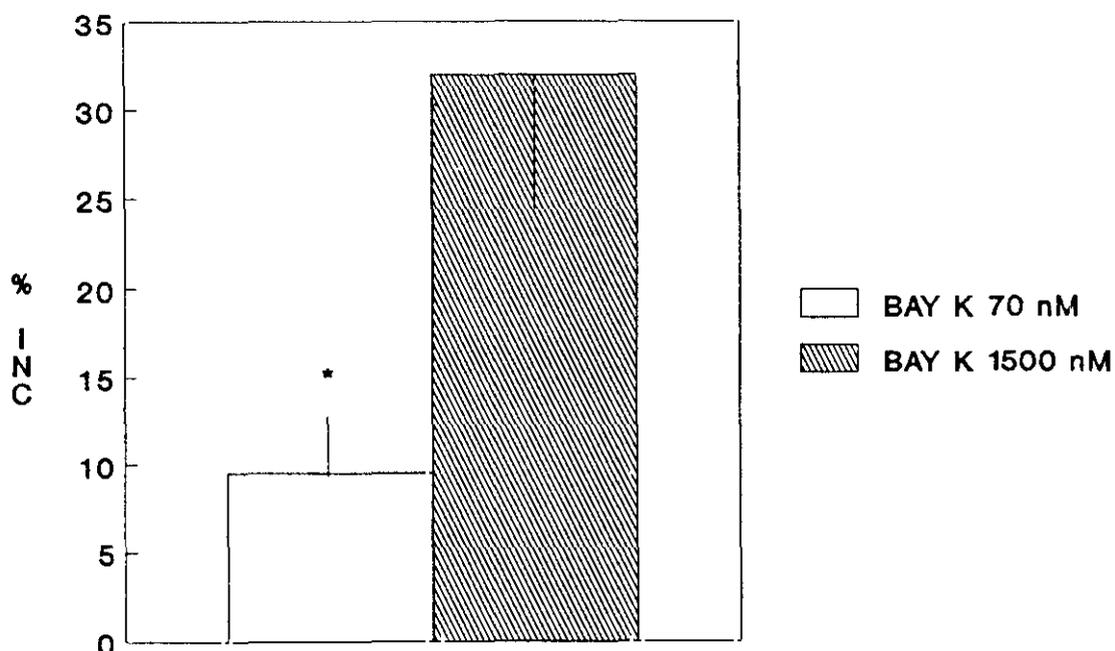


FIGURA 27

Efecto del BAY K 8644 a las concentraciones de 70 y 1500 nM sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (5,4 mM) en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo incubadas en solución KREBS hipercálcica (Ca⁺⁺ 5,4 mM). En el eje de ordenadas se representa el % de incremento de la respuesta contráctil. Cada valor corresponde a la media \pm ESM de al menos siete preparaciones diferentes. *p < 0.05.

IV.2. EFFECTO DE LAS DIHIDROPIRIDINAS ANTAGONISTAS DEL Ca⁺⁺
Y DEL BAY K 8644 ADMINISTRADAS "IN VIVO" EN RATA CONTROL

IV.2.1.- EFECTOS EN EL COMPORTAMIENTO DE LA RATA.

Las DHP antagonistas del Ca⁺⁺ NF, NT (10 mg/kg) y NS (5 mg/kg) administradas vía i.p., no produjeron variación significativa alguna en el comportamiento de la rata con respecto al control.

NM (10 mg/kg), administrada por la misma vía, incrementó los movimientos estereotipados de aseo. (Tabla 5).

El BAY K 8644 se administró vía i.p. en dos dosis diferentes, 0,2 mg/kg y 2 mg/kg. La dosis baja, originó la aparición de erección de la cola de la rata ("straub tail"). La dosis mayor utilizada, originó la aparición de los siguientes síntomas: Arqueamiento del lomo, extensión de los miembros y erección de la cola ("straub tail").

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

Efecto de las DHP antagonistas del Ca⁺⁺ y del BAY K 8644, administrados "in vivo", sobre el comportamiento de la rata. Cada animal fue observado durante 45 min., siendo utilizados al menos 6 animales para cada dosis de fármaco.

FARMACOS (mg/kg)	PARAMETROS				
	ASEO	ARQUEAMIENTO DEL LOMO	ERECCION DE LA COLA	EXTENSION DE MIEMBROS	RASCADO
NF 10	0	0	0	0	0
NM 10	↑	0	0	0	0
NT 10	0	0	0	0	0
NS 5	0	0	0	0	0
BAY K 8644 0,2	0	0	↑	0	0
BAY K 8644 2	0	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	0

0 = 0 a 5 repeticiones, ↑ = 5 a 10 repeticiones, ↑↑ = 10 a 20 repeticiones, ↑↑↑ = más de 20 repeticiones.

IV.2.2.- EFECTOS SOBRE LOS NIVELES DE MONOAMINAS.

La DHP antagonistas del Ca^{++} , se administraron en todos los casos vía i.p. a la dosis de 10 mg/kg para NF, NM y NT y 5 mg/kg para NS. El BAY K 8644 también se administró en todos los casos vía i.p., utilizándose dos dosis 0,2 mg/kg y 2 mg/kg.

IV.2.2.1.- MESENCEFALO.

- Serotonina.

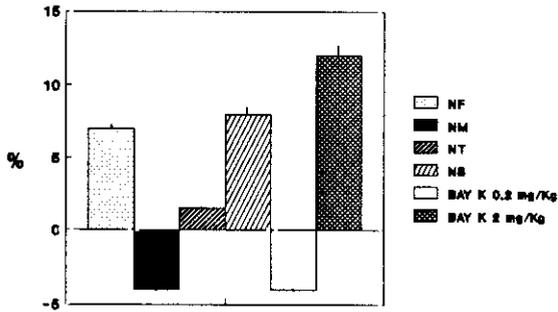
Se valoraron los niveles de 5-HT, Ac. 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice del recambio de 5-HT.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} , no produjeron ninguna variación estadísticamente significativa en los niveles de 5-HT (Fig. 28-A).

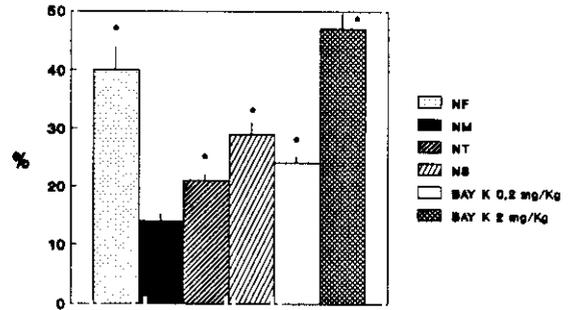
El BAY K 8644 tampoco produjo alteraciones significativas a ninguna de las dos dosis administradas (Fig. 28-A).

Las DHP antagonistas del Ca^{++} , NF, NS y NT produjeron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de 5-HIAA (Fig. 28-B).

A) MESENCEFALO 5-HT



B) MESENCEFALO 5-HIAA



C) MESENCEFALO 5-HIAA/5-HT

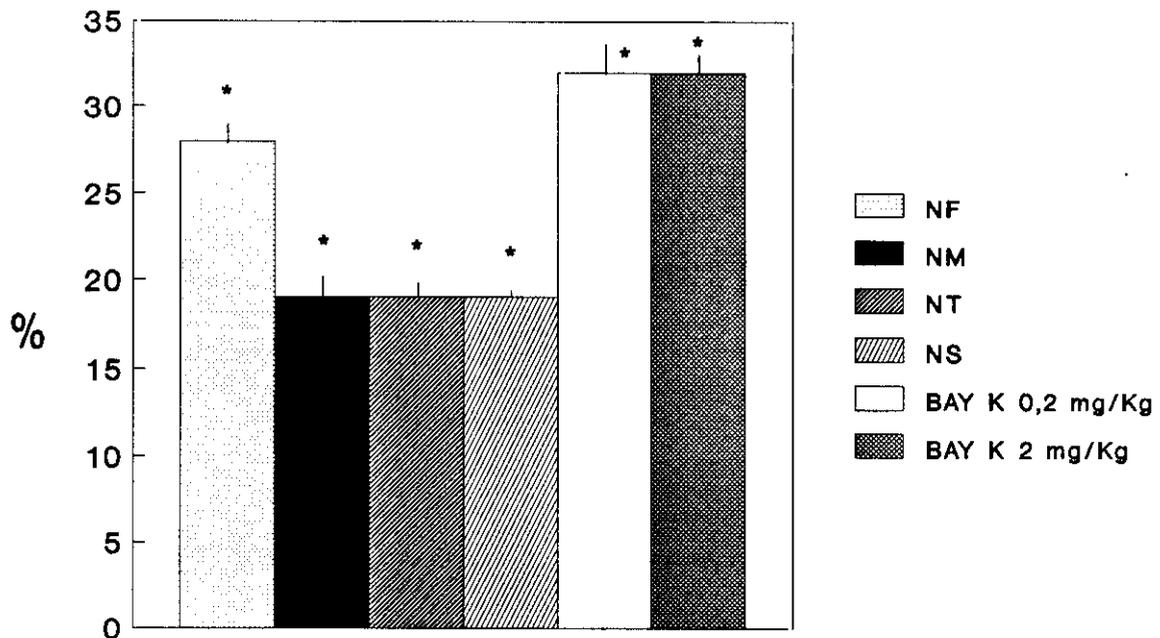


FIGURA 28

Variación (%) respecto a control (0) en los niveles de 5-HT (a); 5-HIAA (b) y en el recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) (c), en mesencéfalo de rata tras la administración i.p. de NF, NM, NT (10 mg/kg), NS (5 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg). Los valores representan la media \pm E.S.M. de al menos 7 ratas. * $p < 0.05$. Valores control de 5-HT: $1253 \pm 70,9$ ng/g y 5-HIAA: $536 \pm 24,7$ ng/g.

El BAY K 8644 originó un incremento de los niveles de 5-HIAA estadísticamente significativo a las dos dosis administradas (Fig. 28-B).

Las DHP antagonistas del Ca^{++} y el BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg) produjeron un incremento significativo en el recambio de 5-HT, que fué más marcado en el caso de BAY K 8644 y NF (Fig. 28-C).

- Noradrenalina.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} y BAY K 8644 a la dosis de 2 mg/kg no produjeron alteraciones significativas en los niveles de NA. Sin embargo, BAY K 8644 a la dosis de 0,2 mg/kg disminuyó significativamente dichos niveles (Tabla 6).

IV.2.2.2.- BULBO.

- Serotonina.

Se valoraron los niveles de 5-HT, 5-HIAA y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice de recambio de 5-HT.

NM incrementó significativamente los niveles de 5-HT. El resto de las DHP antagonistas del Ca^{++} no produjeron ninguna alteración significativa (Fig. 29-A).

TABLA 6

MESENCEFALO

	NA % VARIACION
NF 10 mg/kg	- 2 \pm 0,07 (8)
NM 10 mg/kg	5 \pm 0,35 (7)
NT 10 mg/kg	- 12 \pm 0,74 (7)
NS 5 mg/kg	- 10 \pm 0,28 (7)
BAY K 8644 0,2 mg/kg	- 24 \pm 1,88* (8)
BAY K 8644 2 mg/kg	0,2 \pm 0,01 (6)

Los valores representan la media de al menos seis ratas \pm E.S.M. y se expresan en % de variación con respecto al valor control. *p < 0.05. () = número de ratas.

Valor control: 878 \pm 68,9 ng/g (8).

BAY K 8644 (0,2 mg/kg) no originó efecto significativo en los niveles de 5-HT. Por el contrario, la dosis de 2 mg/kg incrementó los valores de 5-HT. Dicho incremento fue más marcado que el originado por NM (Fig. 29-A).

NM, NT y BAY K 8644 a la dosis de 2 mg/kg produjeron un incremento de los valores de 5-HIAA. NF, NS y BAY K 8644 a la dosis de 0,2 mg/kg carecieron de efecto significativo (Fig. 29-B).

NF y NT incrementaron el cociente 5-HIAA/5-HT. El BAY K 8644 también produjo un aumento significativo del cociente 5-HIAA/5-HT a las dos dosis utilizadas (Fig. 29-C).

NM y NS no produjeron variación significativa (Fig. 29-C).

- Noradrenalina.

NM, NT y BAY K 8644 (2 mg/kg) incrementaron significativamente los niveles de NA (Tabla 7).

NF, NS y BAY K 8644 (0,2 mg/kg) no produjeron variaciones significativas.

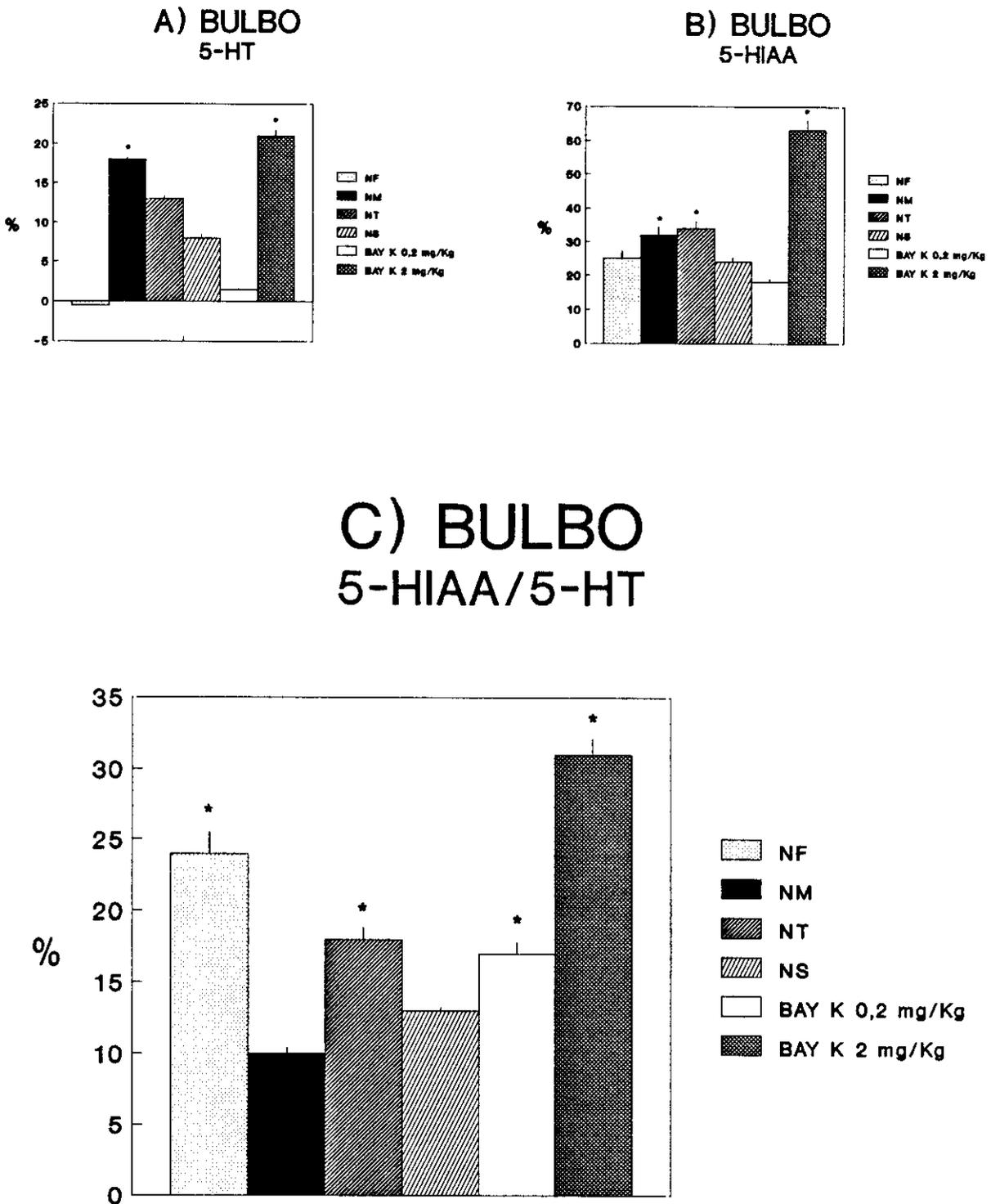


FIGURA 29

Variación (%) respecto a control (0) de los niveles de 5-HT (a), 5-HIAA (b) y en el recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) (c) en bulbo de rata, tras la administración i.p. de NF, NM, NT (10 mg/kg), NS (5 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg). Los valores representan la media + E.S.M. de al menos 7 ratas. * $p < 0.05$. Valores control de $\bar{5}$ -HT: $845 \pm 49,9$ ng/g y 5-HIAA: $315 \pm 17,1$ ng/g.

TABLA 7

BULBO

	NA % VARIACION
NF 10 mg/kg	25 \pm 1,50 (7)
NM 10 mg/kg	60 \pm 7,60* (7)
NT 10 mg/kg	68 \pm 8,49* (7)
NS 5 mg/kg	44 \pm 4,45 (7)
BAY K 8644 0,2 mg/kg	-20 \pm 1,34 (7)
BAY K 8644 2 mg/kg	47 \pm 7,23* (7)

Los valores representan la media de al menos siete ratas \pm E.S.M. y se expresan en % de variación con respecto al valor control. *p < 0.05. () = número de datos.

Valor control: 842 \pm 56,5 ng/g (7).

IV.2.2.3.- HIPOCAMPO.

- Serotonina.

Se valoraron los niveles de 5-HT, 5-HIAA y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice de recambio de 5-HT.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} y el BAY K 8644 a las dosis empleadas, no produjeron ninguna alteración estadísticamente significativa sobre los niveles de 5-HT (Fig. 30-A).

Las DHP antagonistas del Ca^{++} incrementaron los niveles de 5-HIAA, siendo dicho incremento más marcado en el caso de NT (Fig. 30-B).

El BAY K 8644 también produjo un incremento en los niveles de 5-HIAA a las dosis administradas (Fig. 30-B).

NF, NT, NS y BAY K 8644 a la dosis de 2 mg/kg incrementaron el cociente 5-HIAA/5-HT de manera estadísticamente significativa. Este efecto fue más marcado con BAY K 8644 y con NF (Fig. 30-C).

NM y BAY K 8644 a la dosis de 0,2 mg/kg no alteraron significativamente el cociente 5-HIAA/5-HT (Fig. 30-C).

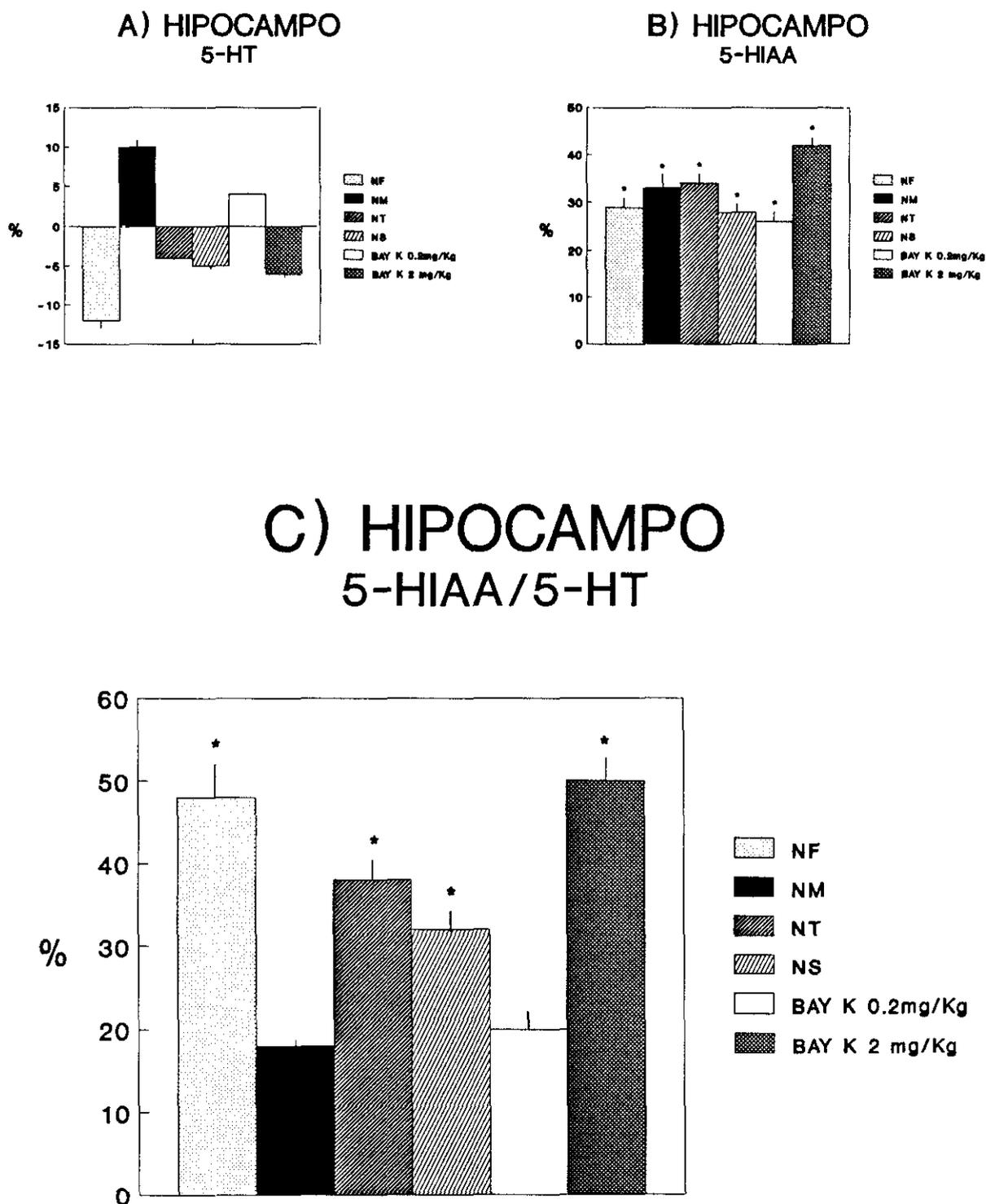


FIGURA 30

Variación (%) respecto a control (0) en los niveles de 5-HT (a), 5-HIAA (b) y en el recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) (c), en hipocampo de rata, tras la administración i.p. de NF, NM, NT (10 mg/kg), NS (5 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg). Los valores representan la media + E.S.M. de al menos 7 ratas. *p < 0.05. Valores control de 5-HT: 408 ± 31,7 ng/g y 5-HIAA: 199 ± 15,5 ng/g.

- Noradrenalina.

Ni las DHP antagonistas del Ca^{++} ni las dos dosis de BAY K 8644 produjeron alteración significativa en los niveles de NA (Tabla 8).

IV.2.2.4.- CORTEZA CEREBRAL.

- Serotonina.

Se valoraron los niveles de 5-HT, 5-HIAA y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice del recambio de 5-HT.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} produjeron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de 5-HT (Fig. 31-A).

El BAY K 8644 no produjo alteraciones significativas a ninguna de las dos dosis empleadas (Fig. 31-A).

Las DHP antagonistas del Ca^{++} y BAY K 8644 (0,2 mg/kg) no produjeron modificación significativa en los valores de 5-HIAA. BAY K 8644 (2 mg/kg) incrementó significativamente dichos valores (Fig. 31-B).

NF, NT, NS y BAY K 8644 (2 mg/kg) produjeron un aumento significativo en el cociente 5-HIAA/5-HT, siendo

TABLA 8

HIPOCAMPO

	NA % VARIACION
NF 10 mg/kg	- 1 \pm 0,12 (8)
NM 10 mg/kg	20 \pm 1,51 (7)
NT 10 mg/kg	21 \pm 1,30 (8)
NS 5 mg/kg	15 \pm 1,75 (7)
BAY K 8644 0,2 mg/kg	6 \pm 0,41 (8)
BAY K 8644 2 mg/kg	-6 \pm 0,67 (7)

Los valores representan la media de al menos siete ratas \pm E.S.M. y se expresan en % de variación con respecto al valor control. () = número de datos.

Valor control: 518 \pm 35,9 ng/g (8).

más pronunciado en el caso de BAY K 8644 y NF. NM y BAY K 8644 (0,2 mg/kg) no modificaron el cociente 5-HIAA/5-HT (Fig. 31-C).

- Noradrenalina.

Ni las DHP antagonistas del Ca^{++} , ni las dos dosis de BAY K 8644 utilizadas originaron alteración significativa en los niveles de NA (Tabla 9).

IV.2.2.5.- MEDULA ESPINAL.

- Serotonina.

Se valoraron los niveles de 5-HT, 5-HIAA y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice del recambio de 5-HT.

NT y NS elevaron significativamente los niveles de 5-HT. NF, NM y BAY K 8644 no modificaron significativamente dichos niveles (Fig. 32-A).

NT y NS incrementaron significativamente los niveles de 5-HIAA. NF, NM y BAY K 8644 no produjeron alteración significativa (Fig. 32-B).

NF y BAY K 8644 a la dosis de 0,2 mg/kg incrementaron significativamente el cociente 5-HIAA/5-HT. El resto de fármacos empleados no produjeron alteración significativa (Fig. 32-C).

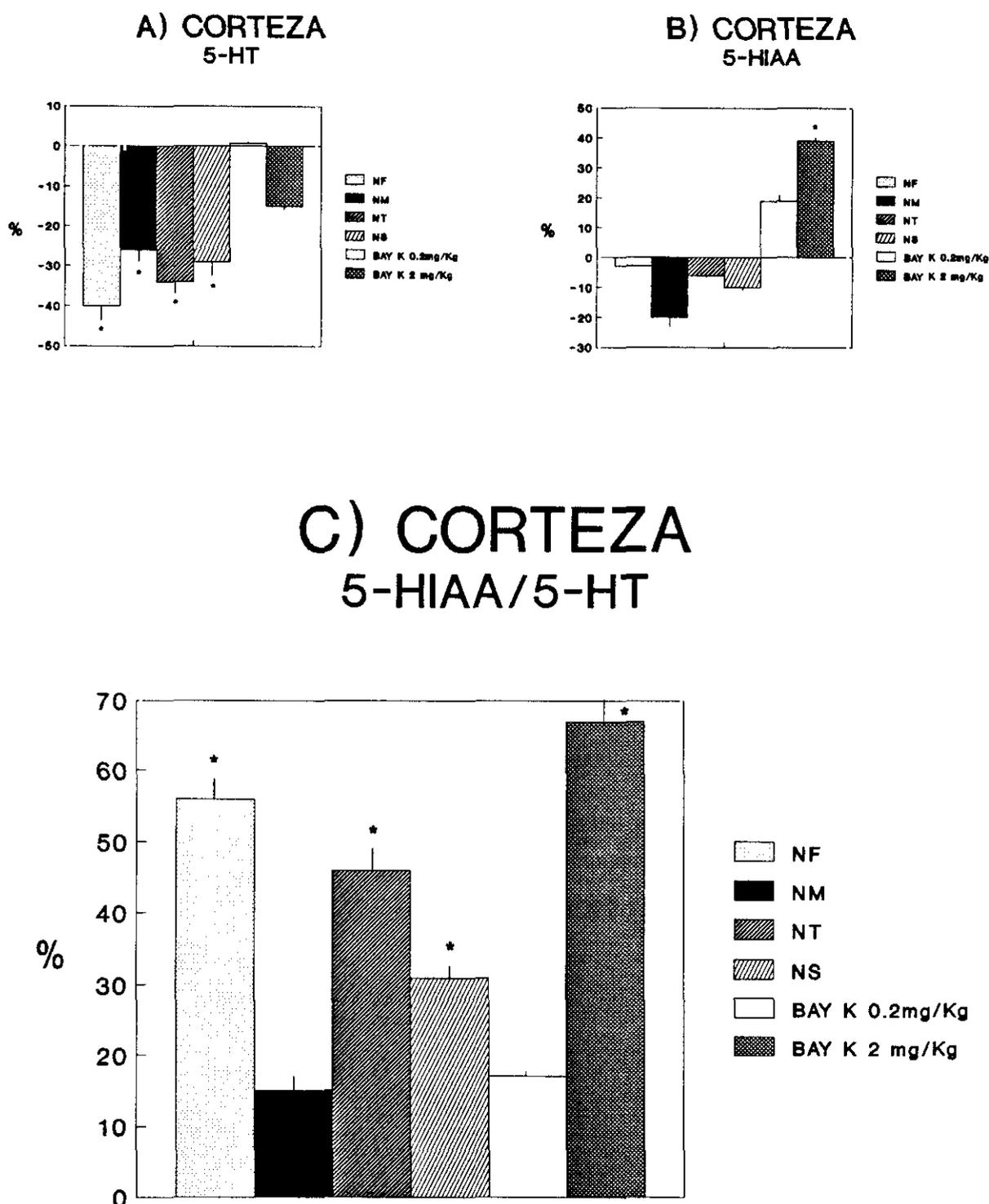


FIGURA 31

Variación (%) respecto a control (0) en los niveles de 5-HT (a), 5-HIAA (b) y en el recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) (c), en la corteza cerebral de rata, tras la administración i.p. de NF, NM, NT (10 mg/kg), NS (5 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg). Los valores representan la media + E.S.M. de al menos 7 ratas. * $p < 0.05$. Valores control de 5-HT: $517 \pm 45,2$ ng/g y 5-HIAA: $205 \pm 20,6$ ng/g.

TABLA 9

CORTEZA CEREBRAL

	NA % VARIACION
NF 10 mg/kg	0 (8)
NF 10 mg/kg	- 6 \pm 0,35 (7)
NT 10 mg/kg	- 9 \pm 0,08 (8)
NS 5 mg/kg	6 \pm 0,51 (8)
BAY K 8644 0,2 mg/kg	- 8 \pm 0,53 (7)
BAY K 8644 2 mg/kg	-12 \pm 1,30 (7)

Los valores representan la media de al menos siete ratas \pm E.S.M. y se expresan en % de variación con respecto al valor control. () = número de datos.

Valor control: 1024 \pm 68,1 ng/g (7).

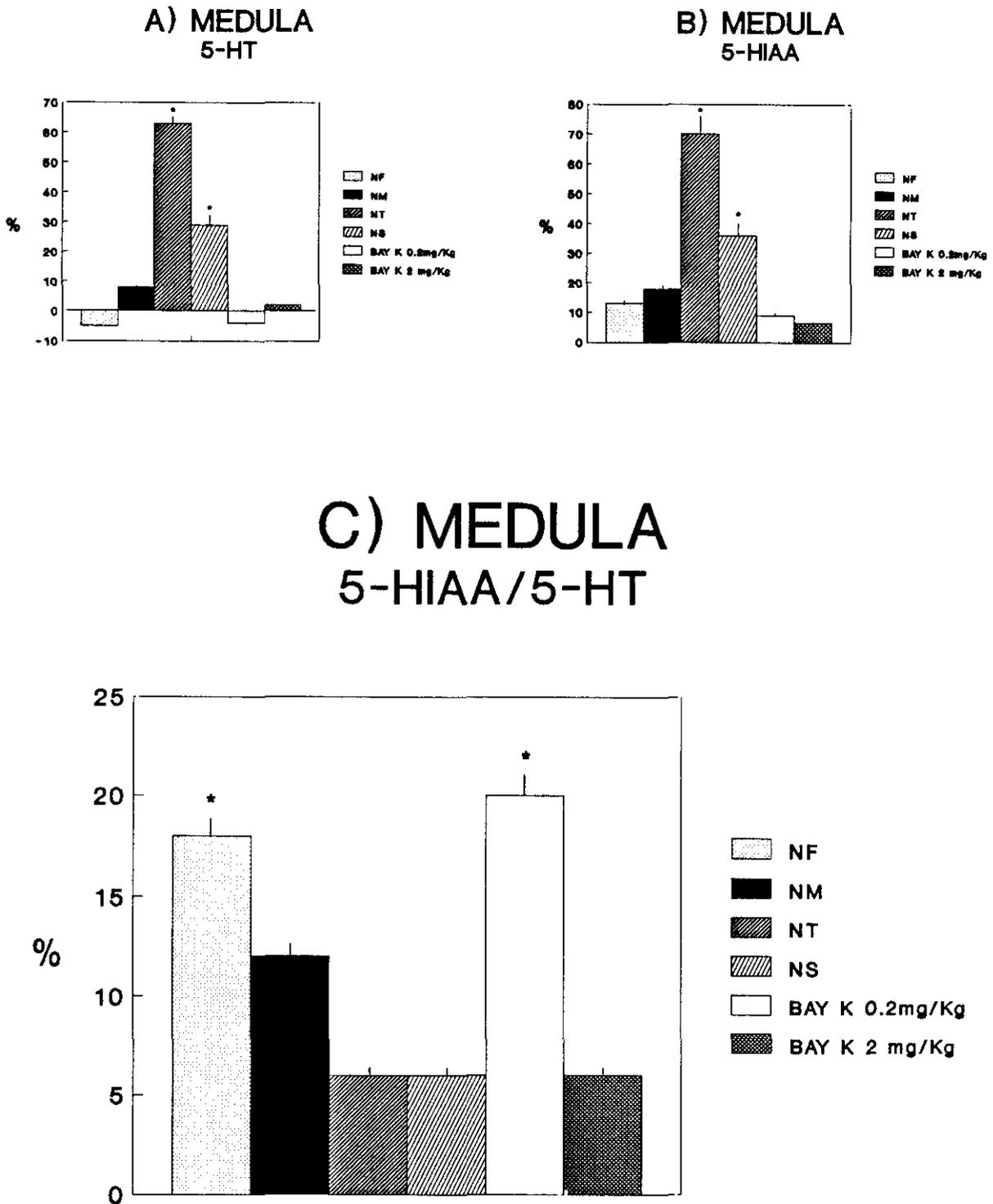


FIGURA 32

Variación (%) respecto a control (0) en los niveles de 5-HT (a), 5-HIAA (b) y en el recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) (c), en médula espinal de rata, tras la administración i.p. de NF, NM, NT (10 mg/kg), NS (5 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 y 2 mg/kg). Los valores representan la media + E.S.M. de al menos 7 ratas. *p < 0.05. Valores control de 5-HT: $987 \pm 76,6$ ng/g y 5-HIAA: $167 \pm 10,9$ ng/g.

- Noradrenalina.

NS incrementó significativamente los niveles de NA. El resto de fármacos empleados no alteró significativamente dichos niveles (Tabla 10).

TABLA 10

MEDULA ESPINAL

	NA % VARIACION
NF 10 mg/kg	- 3 \pm 0,26 (8)
NM 10 mg/kg	22 \pm 2,69 (7)
NT 10 mg/kg	14 \pm 1,46 (7)
NS 5 mg/kg	28 \pm 2,65* (7)
BAY K 8644 0,2 mg/kg	- 8 \pm 0,60 (8)
BAY K 8644 2 mg/kg	17 \pm 1,46 (7)

Los valores representan la media de al menos siete ratas \pm E.S.M. y se expresan en % de variación con respecto al valor control. *p < 0.05. () = número de datos.
Valor control: 1503 \pm 114,2 ng/g (8).

V. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

1.- Las dihidropiridinas antagonistas del Ca^{++} , Nifedipino, Nimodipino, Nitrendipino y Nisoldipino, ejercen un efecto inhibitor dosis-dependiente sobre la contracción inducida por estímulo eléctrico, Ach ($1 \mu M$) y ClK (50 mM) en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo.

Dicho efecto es menos acusado cuando las preparaciones son incubadas en solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM).

En todos los casos, el Nisoldipino demostró ser la dihidropiridina con mayor potencia.

2.- Las dihidropiridinas antagonistas del Ca^{++} ejercen un efecto inhibitor del 100% sobre el componente tónico de la respuesta contráctil inducida por Ach ($1 \mu M$) y ClK (50 mM).

Dicha inhibición fue menos marcada al incubar las preparaciones en solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM) en el caso de las contracciones inducidas por Ach, no habiendo encontrado diferencias significativas en el caso de contracciones inducidas por ClK.

3.- El BAY K 8644 ejerce los siguientes efectos sobre contracciones inducidas por:

- Estímulo eléctrico: Incremento de la respuesta contráctil inversamente proporcional a la dosis utilizada en preparaciones incubadas en solución KREBS normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM). En solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM) la curva dosis-respuesta se desplaza a la derecha.

- Ach (1 μM):
 - * Fásico: Incremento inversamente proporcional a la dosis en preparaciones incubadas en solución KREBS normo e hipercálcica (Ca^{++} 2,7 y 5,4 mM).

 - * Tónico: Inhibición dosis-dependiente en preparaciones incubadas en solución KREBS normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM); mientras que en preparaciones incubadas en solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM), provoca un incremento inversamente proporcional a la dosis.

- ClK (50 mM):
 - * Fásico: Incremento dosis-dependiente en preparaciones incubadas en solución KREBS normo e hipercálcica (Ca^{++} 2,7 y 5,4 mM).

 - * Tónico: Inhibición inversamente proporcional a la dosis utilizada en preparaciones incubadas en solución KREBS normo e hipercálcica (Ca^{++} 2,7 y 5,4 mM).

4.- Las dihidropiridinas antagonistas del Ca^{++} Nifedipino, Nimodipino y Nitrendipino (10 mg/kg) y BAY K 8644 (0,2 mg/kg), no producen alteración sobre el comportamiento de las ratas.

Nisoldipino (5 mg/kg) produce un incremento poco acusado de los movimientos estereotipados, mientras que el BAY K 8644 (2 mg/kg) provoca un síndrome seudoespástico, caracterizado por arqueamiento del lomo, erección de la cola y extensión de los miembros.

5.- Los fármacos estudiados modificaron, en mayor medida, los niveles de 5-HIAA que los de 5-HT en todas las estructuras estudiadas en S.N.C. de rata, excepto en corteza cerebral.

6.- Los fármacos estudiados incrementaron el recambio de 5-HT de la siguiente manera:

- Nifedipino: En todas las estructuras estudiadas.
- Nitrendipino y BAY K 8644 (2 mg/kg): En todas las estructuras estudiadas excepto en Médula Espinal.
- Nisoldipino: En Mesencéfalo, Hipocampo y Corteza Cerebral.
- BAY K 8644 (0,2 mg/kg): En Mesencéfalo, Bulbo y Médula Espinal.
- Nimodipino: En Mesencéfalo.

7.- Los niveles de NA aumentaron en Bulbo tras la administración de Nitrendipino, Nimodipino y BAY K 864 (2 mg/kg), y en Médula tras la administración de NS. BAY K 8644 (0.2 mg/kg) disminuyó dichos niveles en Mesencéfalo.

DISCUSSION

VI. DISCUSION

- Dihidropiridinas en la preparación Fibra Longitudianl-Ple-
xo Mientérico en ileon de cobayo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que las DHP antagonistas del Ca^{++} NF, NM, NT y NS provocan una inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil inducida por E.E. y del componente fásico de dicha respuesta inducida por Ach (1 μ M) y CLK (50 mM) en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo incubadas en solución KREBS normocálcica (Ca^{++} 2,7 mM). La inhibición fue más marcada al provocar la contracción con Ach que con CLK. El componente tónico de la respuesta contráctil, sufrió en ambos casos una inhibición del 100%. Dichos efectos inhibitorios fueron menos acusados en preparaciones similares incubadas en solución KREBS hipercálcica (Ca^{++} 5,4 mM). Estos resultados están básicamente de acuerdo con otros descritos previamente para NF y otros antagonistas del Ca^{++} (INGENITO, 1985; GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987; MARTIN et al. 1988).

La contracción del músculo liso no vascular depende fundamentalmente de los niveles de Ca^{++} libre en el interior celular (VAN BREEMEN et al. 1980). A su vez, la concentración de Ca^{++} libre intracitoplasmático está regulada, por una parte por la concentración de Ca^{++} existente en los depósitos intracelulares, que en el caso del músculo

liso se encuentran localizados, preferentemente, en la cara interna de la membrana citoplasmática; y por otra de la cantidad de Ca^{++} extracelular que es capaz de atravesar la membrana de la célula a través de dos tipos de canales: los VOC y los ROC (BOLTON, 1979). Las DHP (agonistas y anta_gonistas del Ca^{++}) actúan fundamentalmente sobre canales de Ca^{++} VOC tipo L (lentos) (NILIUS et al. 1985; NOWICKI et al. 1985; HIRNING et al. 1988).

El origen del Ca^{++} utilizado para la contracción de la fibra lisa no vascular varía en función del estímulo que provoque la contracción. Así:

El E.E. produce una depolarización de la membrana celular que origina la apertura de los canales de Ca^{++} tipo VOC, favoreciendo la entrada de Ca^{++} al interior de la célula. Además, en la preparación FL-PM de ileon de cobayo, se favorece la liberación de Ach endógena, proveniente en su mayoría (95%), de las neuronas localizadas en el plexo mientérico (PATON et al. 1971; KILBINGER y NAFZINGER, 1985; SHINOZUKA et al. 1985). Dicha liberación de Ach, se ve disminuida al incubar las preparaciones en un medio libre de Ca^{++} (PATON et al. 1971), por lo que se puede pensar que la liberación de Ach endógena depende de la entrada de Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo VOC.

Nuestros resultados se muestran de acuerdo con estas ideas y sugieren que el efecto inhibitorio que producen las DHP antagonistas del Ca^{++} en las contracciones inducidas por E.E. podría obedecer al bloqueo en la entrada de Ca^{++} a través de los VOC en la fibra muscular (inhibición directa de la contracción) y en la terminación nerviosa (inhibición de la liberación de Ach).

Reforzando este criterio, se encuentra el hecho de que al incrementar la concentración de Ca^{++} de 2,7 mM a 5,4 mM, este efecto inhibitorio, fue significativamente menos marcado.

La Ach provoca contracción de la preparación FL-PM de ileon de cobayo, por interactuar con los receptores muscarínicos postsinápticos (PATON et al. 1971; LLINAS, 1982), ésto provoca un incremento de la conductancia total de la membrana celular (KURIYAMA et al. 1967; HUKUHARA y FUKUDA, 1968; BOLTON, 1972) y alteraciones en el trasiego normal del Ca^{++} y otros iones a través de la misma, observándose un incremento de la entrada de Ca^{++} por los canales tipo VOC (BOLTON, 1979; MITCHELSON y ZIEGLER, 1984; GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987).

Por otra parte, la activación de los receptores muscarínicos postsinápticos por Ach, favorece la liberación

del Ca^{++} que se encuentra almacenado en la cara interna de la membrana celular (SUGI y DAIMON, 1977; BOLTON, 1979).

Ya se ha reseñado a lo largo de este trabajo, que la respuesta contráctil inducida por Ach es bifásica, diferenciándose, por tanto, dos componentes, uno rápido (fásico), ligado fundamentalmente a la liberación de Ca^{++} ubicado en los depósitos intracelulares y uno lento (tónico), relacionado con la entrada de Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo VOC (CHANG y TRIGGLE, 1973; TRIGGLE y TRIGGLE, 1976; DANIEL et al. 1979). Esta diferencia en la fuente de Ca^{++} utilizada para la producción de los dos componentes de la respuesta contráctil inducida por Ach, puede explicar por qué las DHP antagonistas del Ca^{++} inhiben con mayor eficacia el componente tónico de la contracción (relacionado con canales de Ca^{++} tipo VOC) (MITCHELSON y ZIEGLER, 1984) y por qué dicho efecto es menos marcado al incrementar la concentración de Ca^{++} extracelular.

En preparación FL-PM de ileon de cobayo, la respuesta contráctil provocada por ClK depende del flujo de entrada de Ca^{++} al interior celular (HURWITZ et al. 1980) que se produce a expensas de la apertura de los canales de Ca^{++} tipo VOC (BOLTON, 1979; LAWSON y CAVERO, 1989).

La contracción originada por ClK, al igual que sucede con la provocada por Ach, es bifásica y también se

describe un componente rápido (fásico) y uno lento y mantenido (tónico), ambos componentes de la respuesta contráctil están mediados por la apertura de canales de Ca^{++} tipo VOC diferentes (HURWITZ et al. 1980), de tal forma que los que están relacionados con la producción del componente fásico constituirían el denominado sistema P y los relacionados con el componente tónico constituirían el sistema T (GOLENHOFEN, 1976; BOEV et al. 1976).

Aunque todos estos datos inducen a pensar que debe existir una mayor sensibilidad al efecto inhibitorio provocado por las DHP antagonistas del Ca^{++} sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK que en la inducida por Ach, nuestros resultados parecen demostrar que el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por Ach es más sensible al efecto inhibitorio de las DHP antagonistas del Ca^{++} que su homólogo inducido por ClK, si bien es cierto, que sólo existieron diferencias estadísticamente significativas para algunas de las DHP estudiadas y a determinadas concentraciones.

La explicación para este resultado "paradójico", se nos escapa, sin embargo, podría estar relacionado con: a) la existencia de una población de canales de Ca^{++} tipo VOC heterogénea, como ya apuntaban GOLENHOFEN (1976), BOEV et al. (1976), COLLIS y SHEPHERD (1979) y HURWITZ et al. (1980), b) con la distribución irregular de los puntos de

unión para DHP (FERRY et al. 1983a) y c) con el estado cinético del canal que podría interferir el acoplamiento DHP/Punto de unión (TRIGGLE, 1988).

La inhibición completa del componente tónico de la contracción inducida por ClK, parece ser debida, fundamentalmente, al bloqueo del paso del Ca^{++} a través de los VOC que producen las DHP antagonistas del Ca^{++} . El que dicho efecto inhibitorio se mantenga cuantitativamente constante incluso al incrementar la concentración de Ca^{++} extracelular de 2,7 mM a 5,4 mM, puede atribuirse a que la contracción inducida por ClK depende del Ca^{++} extracelular, sin que hayan descrito aumentos en la liberación del Ca^{++} intracelular existente en los depósitos, y del tipo de canal utilizado por el Ca^{++} para pasar al interior celular. La diferencia de sensibilidad entre el componente fásico y el tónico, se podría explicar por este mismo hecho (GRBOVIC y RADMANOVIC, 1987).

El BAY K 8644 es una DHP que tiene su punto de acción en el mismo lugar que el resto de sus compañeros de grupo farmacológico (GLOSSMAN et al. 1983b; SARMIENTO et al. 1984b) incluso compite con ellos para conseguir acoplarse (BELLEMAN, 1984; SARMIENTO et al. 1984b; DONOSO y HUI DOBRO, 1986; KULLAK et al. 1987), pero difiere en su efecto farmacológico, ya que, a determinadas concentraciones, favo

rece el paso de Ca^{++} al interior celular a través de los canales de Ca^{++} tipo VOC-L, pero al incrementar las mismas, se produce un cambio en su farmacodinámica comportándose como un antagonista del Ca^{++} .

Esto ha sido demostrado en preparaciones aisladas de músculo cardíaco, en las que concentraciones elevadas de BAY K 8644 ($< 10^{-7}\text{M}$) originaron efectos propios de un antagonista del Ca^{++} (inotropismo (-)), mientras que a concentraciones menores (10^{-9}M) se comportó como un agonista de los canales de Ca^{++} (VAGHY et al. 1984a; THOMAS et al. 1984; SCHRAMM et al. 1985).

Los resultados que hemos obtenido en la preparación FL-PM de ileon de cobayo, confirman que el BAY K 8644 tiene un comportamiento diferente en función de la dosis. En preparaciones estimuladas eléctricamente produce un incremento de la respuesta contráctil relacionado con la dosis de manera inversamente proporcional, así las dosis más altas no sólo no incrementan la respuesta contráctil, sino que producen una inhibición de la misma. Si incrementamos la concentración de Ca^{++} extracelular (2,7 mM a 5,4 mM), conseguimos un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la derecha; es decir, debemos incrementar la concentración de BAY K 8644 para ver la aparición de su efecto antagonista. Este resultado es paralelo al obtenido con

las DHP antagonistas del Ca^{++} , en las que ya observamos una disminución de su efecto inhibitor al incrementar la concentración de Ca^{++} extracelular. Este hecho, nos reafirma en la idea de que el BAY K 8644 a las concentraciones más altas utilizadas en este trabajo (600 - 1500 nM), bloquea parcialmente el paso del Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo VOC-L.

El BAY K 8644, químicamente es un análogo de el NF, pero presenta un átomo de carbono en posición 4 que es asimétrico, por lo que se describe la existencia de dos enantiómeros, uno (+), el BAY R 4407 y uno (-) el BAY R 5417. El primero ha demostrado tener una actividad antagonista del Ca^{++} cualitativamente comparable a la de NF o NM (SCHRAMM et al. 1985). El enantiómero (-) es un agonista del Ca^{++} con efectos farmacológicos, al menos, sobre músculo liso vascular y músculo cardíaco cualitativamente comparable, pero cuantitativamente más potente que los de la mezcla racémica utilizada habitualmente (SCHRAMM et al. 1985; FRANCKOWIAK et al. 1985). Esto, podría explicar, parcialmente al menos, el comportamiento divalente del BAY K 8644.

Los efectos sobre los componentes fásico y tónico de la respuesta contráctil inducida por Ach (1 μM) y sobre el componente tónico de la respuesta contráctil inducida

por ClK (50 mM) concuerdan con lo expuesto hasta aquí, de tal forma que el BAYK 8644 siempre demostró tener actividad antagonista del Ca^{++} a la concentración más alta utilizada (600 nM), la cual fue menos marcada al incrementar la concentración de Ca^{++} extracelular (Ca^{++} 5,4 mM).

Por el contrario, el efecto que produce sobre el componente fásico de la respuesta contráctil inducida por ClK (50 mM) muestra una mayor actividad agonista al incrementar la concentración del fármaco, efecto que se mantiene al aumentar la concentración de Ca^{++} extracelular (Ca^{++} 5,4 mM).

Tal vez, este comportamiento del BAYK 8644 podría ser explicado en base a la existencia de una población heterogénea de canales VOC (GOLENHOFEN, 1976; BOEV et al. 1976; COLLIS y SHEPHERD, 1979; HURWITZ et al. 1980). Además sabemos que el canal se puede encontrar en estados cinéticos diferentes (R, A, I) (SANGUINETTI y KASS, 1984), que el estado en el que se encuentre depende, entre otras cosas del potencial de membrana celular (BEAN et al. 1987) y que nosotros podemos inducir variaciones en dicho potencial al depolarizar la preparación con ClK, provocando alteraciones en la afinidad fármaco-receptor.

Por otra parte, trabajos realizados con DHP anta-

gonistas del Ca^{++} parecen demostrar la existencia de diferentes tipos de canales de Ca^{++} tipo VOC-L (BEAN et al. 1987). Las DHP tendrían capacidad de actuación sobre estos canales a bajas concentraciones, pudiendo actuar sobre canales VOC-T a concentraciones más elevadas (BEAN et al. 1987) lo que podría justificar el efecto dosis-dependiente del BAY K 8644, al existir la posibilidad de que pueda actuar sobre otro tipo de canal VOC.

En contra de todo esto se encuentran las observaciones realizadas por NOWICKY et al. (1985) en las que se sugiere que el BAY K 8644 incrementa la corriente de Ca^{++} a través de los canales tipo VOC-L, dicho efecto no lo aprecian en canales tipo T o N.

Queda pues la discusión abierta en este punto, siéndonos difícil asegurar las razones de este irregular comportamiento del BAY K 8644.

- Dihidropridinas. Alteraciones sobre comportamiento.

Nuestro resultados demuestran, que en los parámetros observados, las DHP antagonistas del Ca^{++} , en general, no producen alteración significativa del comportamiento a las concentraciones utilizadas y administradas por vía i.p. en ratas controles.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores en ratones (GREBB, 1986; KAVALIERS, 1987; CONTRERAS et al. 1988) aunque, al utilizar dosis superiores a las usadas por nosotros (hasta 5 veces superiores) describen una disminución de la motilidad e incluso muerte del animal para algunas DHP antagonistas del Ca^{++} (NM, NS) (GREBB, 1986).

Existe abundante bibliografía sobre el efecto de las DHP antagonistas del Ca^{++} administradas "in vivo" en animales tratados previa o posteriormente a su administración, con fármacos como morfina (OHNISHI et al. 1988; CONTRERAS et al. 1988); BAY K 8644 (BOLGER et al. 1985), Iminodipropionitrilo (CADET et al. 1988), Anfetaminas (GREBB, 1986), y, en general, sustancias que pueden producir "per se" alteraciones en el normal comportamiento del animal de experimentación, generalmente, debidas a modificaciones en el trasiego de Ca^{++} y en la liberación de monoaminas (CADET et al. 1988).

Dichas alteraciones si pueden ser revertidas o modificadas por las DHP antagonistas del Ca^{++} (BENEDEK y SZIKSZAY, 1984; OHNISHI et al. 1988), y por tanto, en cierto sentido, se puede hablar de que las DHP antagonistas del Ca^{++} varían el comportamiento animal, pero generalmente partiendo de un estado que se puede considerar como no fisiológico.

Esto, probablemente, sugiere que el efecto de las DHP antagonistas del Ca^{++} , se pone de manifiesto en condiciones patológicas, o mejor dicho, no fisiológicas.

Los resultados obtenidos con el BAY K 8644 (0,2 mg/kg y 2 mg/kg) se pueden resumir en que sólo la dosis de 2 mg/kg produce un incremento marcado en la repetición de los parámetros: Arqueamiento del lomo, Erección de la cola y Extensión de los miembros, es decir, todos fenómenos relacionados con un aumento del tono muscular.

Esto coincide con otros resultados hallados en la bibliografía (BOLGER et al. 1985; PETERSEN, 1986; BOURSON et al. 1989) en los que se describe la existencia de un síndrome "pseudoespástico" en la rata tras la administración de BAY K 8644 i.p.. Estos efectos son revertidos por NF y probablemente sean debidos a la activación de los canales de Ca^{++} localizados en el cerebro y a las consecuen

cias que ello conlleva sobre los mecanismos presinápticos que controlan la liberación de neurotransmisores (BOURSON et al. 1986).

El BAY K 8644 provoca una disminución de la actividad psicomotora, aumento de la Presión Arterial, y prolongación del tiempo de latencia en el test de analgesia realizado en la cola de rata (BERGE et al. 1988; BOURSON et al. 1989), aunque este último efecto se ha explicado por su acción vasoconstrictora periférica (BOURSON et al. 1986). Por otra parte, sólo la hipomotilidad y la aparición de los cambios posturales se reproducen tras la administración de BAY K 8644 (5-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) vía i.c.v., lo que sugiere que el resto de efectos observados estarían mediados periféricamente (BOURSON et al. 1989).

- Dihidropiridinas. Alteraciones en los niveles de monoaminas.

Nuestro resultados demuestran que las DHP agonistas y antagonistas del Ca^{++} incrementan la neurotransmisión serotoninérgica en S.N.C. de rata.

Las DHP antagonistas del Ca^{++} NF, NM, NT y NS aumentan el recambio de 5-HT en la mayoría de las estructuras de S.N.C. que hemos estudiado, principalmente por incrementar los niveles de su metabolito más importante (5-HIAA). Sin embargo, en corteza cerebral, el aumento del recambio se produce no como consecuencia de una elevación de 5-HIAA, sino debido a una disminución de 5-HT.

El BAY K 8644 provoca un incremento en la concentración de 5-HIAA dosis-dependiente, pero no altera significativamente las concentraciones de 5-HT. Esto sugiere que el BAY K 8644 aumenta el recambio de 5-HT y concuerda con la idea, de que el BAY K 8644, como agonista del Ca^{++} , incrementa la depolarización dependiente de la entrada de Ca^{++} al interior celular y la liberación de 5-HT en preparaciones de corteza cerebral (MIDDLEMISS y SPEDDING 1985). Sin embargo, el hecho de que las DHP antagonistas del Ca^{++} también aumenten el metabolismo de 5-HT, indica que el efecto que produce BAY K 8644, no es atribuible exclusivamente a la activación de canales de Ca^{++} tipo VOC, sino

que posiblemente es atribuible, además, a un mecanismo inespecífico.

Por otra parte, a las dosis utilizadas no hemos encontrado una respuesta bifásica similar a la descrita por HOFFMEISTER y TETTENBORN (1986). Estos autores describieron que el BAY K 8644 a bajas dosis (1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) disminuye el efecto antinociceptivo del fentanilo, mientras que a dosis más elevadas (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) lo potencia. Estos efectos, eran descritos tras la administración del BAY K 8644 vía i.v., mientras que en nuestro trabajo lo hemos administrado vía i.p., y está descrito, que el perfil de actividad del BAY K 8644 cambia en función de la vía de administración (BOURSON et al. 1989).

El efecto provocado por las DHP agonista y antagonistas del Ca^{++} , no fue evidente sólo en las regiones del cerebro con mayor densidad de canales de Ca^{++} tipo VOC (Hipocampo y Corteza Cerebral) (GOULD et al. 1985), sino también en Médula y Mesencéfalo, que son regiones cerebrales con baja o muy baja densidad de puntos de unión para DHP. Esto, podría ser debido, a que las DHP antagonistas del Ca^{++} interactúan con diferentes tipos de receptor, e incluso, alguno de sus efectos, probablemente sean inducidos por acciones indirectas (GAGGI y GIANNI, 1990).

Se ha descrito que el NF potencia los efectos de la adenosina o interactúa con un receptor de adenosina (SWANSON y GREEN, 1986), inhibe el recambio de fosfatidil inositol (KENDALL y NAHORSKI, 1985) o interactúa con la Ca^{++} -ATPasa (DAVID DUPHILO, 1984). Además todos los fármacos estudiados, a las dosis administradas, producen marcados efectos sobre la función cardíaca y la presión arterial (BOURSON et al. 1989). Estos efectos periféricos podrían también mediar importantes acciones a nivel central.

PILEBLAD y CARLSSON (1987), han observado una disminución de la síntesis de 5-Hidroxitriptófano en sistema límbico tras la administración de NM y BAY K 8644 en ratón. Este resultado podría indicar un aumento en la hidroxilación del triptófano mediada por DHP. En este sentido sería interesante apuntar que los canales de Ca^{++} VOC-L localizados en el soma celular, podrían estar implicados en la regulación de múltiples funciones neuronales.

Utilizando el test descrito por PORSOLT et al. (1977) para valorar la actividad antidepresiva de un fármaco, MOGILNICKA et al. (1987) sugieren que NF podría tener cierta actividad antidepresiva, que tal vez estaría relacionada con el aumento en la neurotransmisión serotoninérgica que provocan, en general, las DHP antagonistas del Ca^{++} .

En resumen, los resultados de nuestro trabajo muestran que las DHP antagonistas del Ca^{++} (NF, NM, NT y NS) y agonista del Ca^{++} (BAY K 8644) producen, en general, un incremento del recambio de 5-HT. El hecho de que estos fármacos afecten a la neurotransmisión serotoninérgica de manera similar nos hace pensar que este efecto podría estar mediado por mecanismos diferentes a la interacción con los canales de Ca^{++} tipo VOC.

Por otra parte, los resultados que hemos obtenido en relación con la modificación en los niveles de NA provocada por DHP agonistas y antagonistas del Ca^{++} , muestran que en, prácticamente todas las estructuras estudiadas las DHP antagonistas del Ca^{++} utilizadas en nuestro trabajo, carecen de efectos significativos sobre los valores de NA, excepto en el caso de Bulbo y Médula Espinal, donde NM y NT y BAY K 8644 (2 mg/kg) en el primero y NS en la última, incrementan los niveles de NA.

Por otra parte, el BAY K 8644 (0,2 mg/kg), se muestra ineficaz a la hora de alterar los valores de NA, excepto en Mesencéfalo donde los disminuye.

Nuestros datos no concuerdan con los obtenidos por otros equipos de investigación, así GAGGI y GIANNI (1990), obtuvieron que NF (20 mg/kg) produce una disminu-

ción de entre un 16-35% en los niveles de NA en todas las estructuras cerebrales que estudiaron excepto en hipocampo; por otra parte, PILEBLAD y CARLSSON (1987) obtienen una disminución en la síntesis de DOPA (en estriado y sistema límbico) y de NA (en hemisferios) tras la administración de NM a ratones albinos; además se ha descrito que el BAY K 8644 origina un incremento de la liberación de NA y 5-HT, entre otras sustancias, en depolarizaciones inducidas por K^+ (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985). BOURSON et al. (1989), utilizando cortes de cerebro, sugirieron que el BAY K 8644 puede incrementar la liberación de neurotransmisores inducida por K^+ , mientras que los antagonistas del Ca^{++} carecían de efecto.

Este comportamiento peculiar de las DHP agonistas y antagonistas del Ca^{++} se ha tratado de explicar sugiriendo que en el cerebro, pueden existir canales de Ca^{++} que, bajo determinadas circunstancias, quedarían enmascarados (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985), o por la existencia de diferentes tipos de canales VOC, de los que sólo algunos son sensibles a DHP o porque algunos canales de Ca^{++} pierden su actividad en membranas aisladas (NILIUS et al. 1985).

En conclusión, son demasiados los factores o las circunstancias que pueden influir sobre el efecto de las DHP agonistas y antagonistas del Ca^{++} , y es muy arriesgado

atribuir dicho efecto a una sola causa, cuando muy probablemente tenga un origen multifactorial.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- 1.- En preparación FL-PM de ileon de cobayo las DHP antagonistas del Ca^{++} , NF, NM, NT y NS bloquean el paso de este ión a través de los canales de Ca^{++} , probablemente, tipo VOC.
- 2.- La DHP agonista del Ca^{++} BAY K 8644 presenta un efecto bifásico a nivel periférico que parece estar relacionado con los canales de Ca^{++} tipo VOC y con la dosis de fármaco administrada.
- 3.- Las DHP antagonistas del Ca^{++} , NF, NM, NT y NS administradas "in vivo", no provocan alteraciones en el comportamiento de los animales de experimentación en condiciones fisiológicas.
- 4.- La DHP agonista del Ca^{++} BAY K 8644 administrada "in vivo" provoca alteraciones en el comportamiento del animal de experimentación, en condiciones fisiológicas, debido posiblemente a un mecanismo de acción periférico y central.
- 5.- Las DHP agonistas y antagonistas del Ca^{++} ocasionan un aumento de la neurotransmisión serotoninérgica, aunque no hemos podido esclarecer el mecanismo por el que se produce.

BIBLIOGRAFIA

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- AHR, G. y KUHLMANN, J. (1988):
The clinical pharmacology of nisoldipine. In: Recent aspects in calcium antagonism: Nisoldipine. Ed. P.R. Litchtlen y P.G. Hugenholtz. Schattauer. Stuttgart-New York. 1988. pp. 11.
- AHR, G., WINGENDER, W. y KUHLMANN, J. (1987):
Pharmacokinetics of nisoldipine. In: Nisoldipine 1987. Ed.: P.G. Hugenholtz y J. Meyer. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. pp. 59-66.
- ALBERTS, P. y ÖGREN, V.R. (1988):
Interaction of forskolin with the effect of atropine on [³H] acetylcholine secretion in guinea-pig ileum myenteric plexus. J.Physiol. 395: 441-453.
- ALBERTS, P. y STJÄRNE, L. (1982):
Secretion of ³H-acetylcholine from guinea-pig ileum myenteric plexus in enhanced by 8-Br adenosine 3'5'-cyclic monophosphate but not changed by 8-Br guanosine 3'5'-cyclic monophosphate. Acta Physiol.Scand. 115: 269-272.
- ALMERS, W. y McCLESCKEY, E.W. (1984):
Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. J.Physiol. (London) 353: 585-608.
- ALMERS, W., FINK, R. y PALADE, P.T. (1981):
Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization. J.Physiol. (London) 312: 177-207.
- AMBACHE, N. (1954):
Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet. J.Physiol. 127: 53-54P.
- ANDERSSON, R., NILSSON, K., WIKBERG, J., JOHANSSON, S., MOHME-LUNDHOLM, E. y LUNDHOLM, L. (1975):
Cyclic nucleotides and the contraction of smooth muscle. In: Advances in Cyclic Nucleotides Research, ed. by G.I. Drummond, P. Greengard and G.A. Robinson. New York: Raven, Vol. 5 pp. 491-518.
- ANDERSSON, R.G.G. (1973):
Relationship between cyclic AMP, phosphodiesterase activity, calcium and contraction in intestinal smooth muscle. Acta Physiol.Scand. 87: 348-358.

- ANDERSSON, R.G.G. y DJÄRV, L. (1978):
Tension and cyclic GMP changes in potassium depolarized rabbit colon muscle. *Acta Physiol.Scand.* 102: 410-419.
- ARTALEJO, C.R. y GARCIA, A.G. (1986):
Calcio-antagonistas: Bases farmacológicas para su manejo clínico. *Farmacoterapia* 3(3): 1-14.
- BAARNHEILM, C. y HANSSON, G. (1986):
Oxidation of 1,4-dihydropyridines by prostaglandin synthetase and the peroxidic function of cytochrome P-450. Demonstration of a free radical intermediate. *Biochem.Pharmacol.* 35: 1419-1422.
- BAKER, P.F. y GLITISCH, H.G. (1975):
Voltage-dependent changes in the permeability of nerve membranes to calcium and other divalent cations. *Philos. Trans.R.Soc. London B.* 270: 389-409.
- BANARJEE, A.K. (1972):
The influence of drugs upon $^{42}\text{K}^+$ fluxes in guinea-pig ileum in vitro. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 198: 173-186.
- BATRA, S. (1985):
Characterization of [^3H]nitrendipine binding to uterine smooth muscle plasma membrane and its relevance to inhibition of calcium entry. *Br.J.Pharmacol.* 85: 767-774.
- BEAM, K.G. y GREENGARD, P. (1976):
Cyclic nucleotides, protein phosphorylation and synaptic function. *Cold Spring Harb. Symp.Quant.Biol.* 40: 157-168.
- BEAN, B.P. (1984):
Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high affinity binding to the inactivate state. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* Vol. 81, pp. 6388-6392.
- BEAN, B.P., STUREK, M., PUGA, A. y HERSMEYER, K. (1987):
Bloqueo de canales de Ca^{++} por nitrendipino en músculo cardíaco y vascular. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* Vol. 9 Supl. (4): 19-27.
- BELLEMANN, P. (1984):
Binding properties of a novel calcium channel activating dihydropyridine in monolayer cultures of beating myocytes. *FEBS Letters* 167: 88-92.

- BELLMAN, P., FERRY, D.R., LUBBECKE, F. y GLOSSMANN, H. (1981):
|³H|nitrendipine a potent calcium antagonist, bind with high affinity to cardiac membranes. *Arzneim.Forsch* 31: 2064-2067.
- BELLEMANN, P., SCHADE, A. y TROWART, R. (1983):
Dihydropyridine receptor in rat brain labelled with |³H|nimodipine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80: 2356-2360.
- BENEDECK, G. y SZIKSZAY, M. (1984):
Potentiation of thermoregulatory and analgesic effects of morphine by calcium antagonists. *Pharmacological Res.Comm.* 16(10): 1009-1018.
- BERGE, O.G., GARCIA-CABRERA, I. y HOLE, K. (1988):
Response latencies in the tail flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci.Lett.* 86: 284.
- BERRIDGE, J.M. y IRVINE, R.F. (1984):
Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
- BEVAN, J.A. y WATERSON, J.E. (1971):
Biphasic constrictor response of the rabbit ear artery. *Circ.Res.* 28: 655-661.
- BEVAN, J.A., GARSTKA, W. y SU, M.O. (1973):
The bimodal basis of the contractile response of the rabbit ear artery to norepinephrine and other agonists. *Eur.J.Pharmacol.* 22: 47-53.
- BIANCHI, C.P. y SHANES, A.M. (1959):
Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity and during potassium contracture. *J.Gen.Physiol* 42: 803-815.
- BIRDSALL, N.J.M. y HULME, E.C. (1983):
Muscarinic receptor subclasses. *Trends Pharmacol.Sci.* 4: 459-463.
- BIRKS, R.I. (1963):
The role of sodium ions in the metabolism of acetylcholine. *Can.J.Biochem.Physiol.* 41: 2573-2597.
- BIRKS, R.I. y MacINTOSH, F.C. (1961):
Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Can.J.Biochem.Physiol.* 39: 787-827.
- BOEV, K., GOLENHOFEN, K. y LUKANOV, J. (1976):
Selective suppression of phasic and tonic activation

- mechanism in stomach smooth muscle. In Physiology of smooth muscle, ed. by E. Bülbring and M.F. Shuba. Raven Press, New York. pp: 203-208.
- BOHR, D.F. (1963):
Vascular smooth muscle: dual effect of calcium. Science 139: 597-599.
- BOLES, R.G., YAMAMURA, H.I., SCHOEMAKER, H. y ROESKE, W.R. (1984):
Temperature-dependent modulation of [3 H]nitrendipine binding by the calcium channel antagonists verapamil and diltiazem in rat brain synaptosomes. J.Pharmacol. Exp.Ther. 229: 333-339.
- BOLGER, G.T., GENGO, P.J., KLOCKONSKI, R., LUCHOWSKI, E., SIEGEL, H., JANIS, R.A., TRIGGLE, A.M. y TRIGGLE, D.J. (1983):
Characterization of binding of Ca^{++} antagonist, [3 H]nitrendipine, to guinea-pig ileal smooth muscle. J.Pharmacol.Exp.Ther. 225: 291-309.
- BOLGER, G.T., GENGO, P.J., LUCHOWSKI, E.M., SIEGEL, H., TRIGGLE, D.J. y JANIS, R.A. (1982):
High affinity binding of a calcium channel antagonist to smooth and cardiac muscle. Biochem.Biophys.Res.Comm. 104: 1604-1609.
- BOLGER, G.T., WEISSMAN, B.A. y SKOLNYK, P. (1985):
The behavioural effects of the calcium agonist BAY K 8644 in the mouse: antagonism by the calcium antagonist nifedipine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 328: 373-377.
- BOLTON, T.B. (1972):
The depolarizing action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. J.Physiol. London 220: 647-671.
- BOLTON, T.B. (1973a):
The permeability change produced by acetylcholine in smooth muscle. In: Drugs receptors, ed. H.P. Rang. London: Macmillan pp. 87-102.
- BOLTON, T.B. (1973b):
Effects of electrogenic sodium pumping on the membrane potential of longitudinal smooth muscle from terminal ileum of guinea-pig. J.Physiol. London 228: 693-712.
- BOLTON, T.B. (1976):
On the latency and form of the membrane responses of

smooth muscle to the iontophoretic application of acetylcholine or carbachol. Proc.R.Soc. London Sr. B. 194: 99-119.

BOLTON, T.B. (1979):

Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol.Rev. 59: 606-718.

BONTING, S.L., CARAVAGGIO, L.L. y HAWKINS, N.M. (1962):

Studies on sodium-potassium-activated adenosine-triphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. Archs.Biochem.Biophys. 98: 413-420.

BORGERS, M. (1985):

Morfological assesment of tissue protection. In: Calcium entry blockers and tissue protection. Ed. T. Godfraind, P.M. Van Houtte, S. Govoni and R. Paoletti. pp: 173-181, Raven Press. New York.

BOSE, D. y INNES, I.R. (1975):

Utilization of calcium pools during pharmaco or electromechanical coupling in smooth muscle. Can.J.Physiol. Pharmacol. 53: 586-591.

BOU, J., LLENAS, J. y MASSINGHAM, R. (1983):

Calcium entry blocking drugs "calcium antagonists" and vascular smooth muscle function. J.Autom.Pharmacol. 3: 219.

BOURSON, A., GOWER, A.J. y MIR, A.K. (1986):

Behavioural effects of BAY K 8644 mediated by central and peripheral mechanisms in the rat. Br.J.Pharmacol. 89: 624P.

BOURSON, A., MOSER, P.C., GOWER, A.J. y MIR, A.K. (1989):

Central and peripheral effects of the dihydropyridine calcium channel activator BAY K 8644 in the rat. Eur. J.Pharmacol. 160: 339-347.

BRADING, A.F. y SNEDDON, P. (1980):

Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig Taenia Coli on stimulation with carbachol. Br.J.Pharmacol. 70: 229-240.

BRANDT, N. (1985):

Identification of two populations of cardiac microsomes with nitrendipine receptors: correlation of the distribution of dihydropyridine receptors with organelle specific markers. Arch.Biochem.Biophys. 242: 306-319.

- BREMEL, R.D. (1974):
Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle. *Nature (Lond.)*, 252: 405-407.
- BREMEL, R.D., SOBIESZEK y SMALL, J.V. (1977):
Regulation of actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle. In: *Biochemistry of Smooth Muscle*, ed. by N.L. Stephus. Baltimore: University Park Press pp. 533:549.
- BRISTOW, M.R., GINSBURG, R., LASER, J.A., McAULEY, B.J. y MINOBE, W. (1984):
Tissue response selectivity of calcium antagonists is not due to heterogeneity of [³H]nitrendipine binding sites. *Br.J.Pharmacol.* 82: 309-320.
- BROWN, D.A., CONSTANTINI, A., DOCHERTY, R.J., GALVAN, M., GAWILER, B. y HALLIWELL, J.V. (1984):
Pharmacology of calcium currents in mammalian central nervous. In: *IUPHAR Ninth International Congress Pharmacology*. London 1984. Proceedings vol. 2, Ed. by W. Paton, J. Mitchel and P. Turner, pp. 343-348. MacMillan Press, Ltd. London.
- BROWN, D.A., FORWARD, A. y MARSH, S. (1980):
Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br.J.Pharmacol.* 71: 362-364.
- BRUM, G. y RIOS, E. (1986):
Calcium and the voltage sensor of skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biophys.J.* 49: 459a.
- BUEHNER, K. y RÄMSCH, K.D. (1984):
Resultados no publicados. Tomado de RÄMSCH et al. 1986
- BÜLBRING, E. y SZURSZEWSKI, J.H. (1974):
The stimulant action of noradrenaline (α -action) on guinea-pig myometrium compared with that of acetylcholine. *Proc.R.Soc.London Ser. B.* 185: 225-262.
- BURGEN, A.S.V. y SPERO, L. (1968):
The action of acetylcholine and other drugs on the efflux of potassium and rubidium from smooth muscle of the guinea-pig intestine. *Br.J.Pharmacol.* 34: 99-115.
- BURGEN, A.S.V. y SPERO, L. (1970):
Effects of calcium and magnesium on the response of intestinal smooth muscle to drugs. *Br.J.Pharmacol.* 40: 492-500.

- BURNSTOCK, G. y STRAUB, R.W. (1958):
A method for studying the effects of ions and drugs on the resting and actions potentials in smooth muscle with external electrodes. *J.Physiol. London* 140: 156-167.
- CADET, J.L., TAYLOR, E. y FREED, W.J. (1988):
The iminodipropionitrile (IDPN)-induced dyskinetic syndrome in mice: Antagonism by the calcium channel antagonist nifedipine. *Pharmacology Biochem.Behav.* 29: 381-385.
- CARPENTER, F.G. y RUBIN, R.M. (1967):
The motor innervation of the rat urinary bladder. *J. Physiol. London* 192: 609-618.
- CEÑA, V., GARCIA, A.G., KHOYI, N.A., SALAICES, M. y SANCHEZ GARCIA, P. (1985):
Effect of the dihydropyridine BAY K 8644 on the release of [³H]noradrenaline from the rat isolated vas deferens. *Br.J.Pharmacol.* 85: 691-696.
- CEÑA, V., NICOLAS, G.P., SANCHEZ GARCIA, P., KIRPEKAR, S.M. y GARCIA, A.G. (1983):
Pharmacological dissection of receptor associated and voltage-sensitive ionic channels involved catecholamine release. *Neurosci.* 10: 1455-1462.
- CHANG, K.J. y TRIGGLE, D.J. (1973):
Quantitative aspects of drug-receptor interactions. 1. Ca⁺⁺ and cholinergic receptor activation in smooth muscle: a basic model for drug-receptor interactions. *J.Ther.Biol.* 40: 125-154.
- CHENG, J.T. (1976):
Calcium-induced release of calcium in rectal smooth muscle of mice. *Jpn.J.Pharmacol.* 26: 73-78.
- CHUJYO, N. y HOLLAND, W.C. (1963):
Potassium-induced contracture and calcium exchange in guinea-pig's taenia coli. *Am.J.Physiol.* 205: 94-100
- CLYMAN, R.I., SANDLER, J.AZ. MANGANIELLO, V.C. y VAUGHAN, M. (1975):
Guanosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery. *J.Clin.Invest.* 55: 1020-1025.
- COLLIER, J.G., NACHEV, C. y ROBINSON, B.F. (1972):
Effect of catecholamines and other vasoactive substances on superficial hand veins in man. *Clin.Sci.* 43: 455-467.

- COLLIS, M.G. y SHEPHERD, J.T. (1979):
Isoproterenol-induced relaxation of venous smooth muscle contracted by agents which mobilize different calcium pools. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 209: 359-365.
- COLVIN, R.A., PEARSON, N., MESSINEO, F.c. y KATZ, A.M. (1982):
Effects of Ca^{++} channel blockers on Ca^{++} transport and Ca^{++} -APTase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 4: 935-941.
- CONTRERAS, E., TAMAYO, L. y AMIGO, M. (1988):
Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Eur.J. Pharmacol.* 148: 463-466.
- CREED, K.E. y GILLESPIE, J.S. (1976):
Pharmacological and electrophysiological properties of the anococcygeus muscle. In *Physiology of smooth muscle*, ed. E. Bülbring and M.F. Shuba. New York: Raven Press, pp. 295-301.
- CREED, K.E., GILLESPIE, J.S. y McCAFFERY, H. (1977):
The rabbit anococcygeus muscle and response to field stimulation and to some drugs. *J.Physiol. London* 273: 121-135.
- CURTIS, B.M. y CATERALL, W.A. (1984):
Purification of calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23: 2113-2118.
- DANIEL, E.E., CRANKSHAW, D.J. y KWAN, C.Y. (1979):
Intracellular sources of calcium for activation of smooth muscle. In *Trends of Autonomic Pharmacology*. Vol. 1 ed. Kalsner, S. Baltimore: Urban and Schwarzenberg. pp. 443-484.
- DASCAL, N., LANDAU, E.M. y LASS, Y. (1984):
Xenopus oocyte resting potential, muscarinic responses and the role of calcium and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J.Physiol.* 352: 551-574.
- DAVID DUPHILO, M., DEVYNK, M.A., KAZDA, S. y MEYER, P. (1984):
Stimulation by nifedipine of calcium transport by cardiac sarcolemmal vesicles from spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* 97: 121-127.

- DEPOVER, A., GRUPP, I.L., GRUPP, G. y SCHWARTZ, A. (1983):
Diltiazem potentiates the negative inotropic action
of nimodipine in heart. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 114:
922-929.
- DEPOVER, A., MATUB, M.A., LEE, S.W., DUBE, G.P., GRUPP, I.L.,
GRUPP, G. y SCHWARTZ, A. (1982):
Specific binding of [³H]nitrendipine to membrane from
coronary arteries and heart in relation to pharmacolo
gical effects. Paradoxical stimulation by diltiazem.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 104: 937-943.
- DETH, R. y VAN BREEMEN, C. (1977):
Agonist induced release of intracellular Ca²⁺ in the
rabbit aorta. *J.Membr.Biol.* 30: 363-380.
- DIAMOND, J. (1977):
Evidence for dissociation between cyclic nucleotide
levels and tension in smooth muscle. In: *Biochemistry
of Smooth Muscle.* ed. N.L. Stephens. Baltimore: Uni-
versity Park Press, pp. 343-360.
- DIAMOND, J. y BLISARD, K.S. (1976):
Effects of stimulant and relaxant drugs on tension
and cyclic nucleotide levels in canine femoral arte-
ry. *Mol.Pharmacol.* 12: 688-692.
- DIAMOND, J. y HARTLE, D.K. (1976):
Cyclic nucleotide levels during carbachol-induced smooth
muscle contractions. *J.Cyclic Nucleotide Res.* 2: 179-188.
- DIKSHIT; B.B. (1938):
Acetylcholine formation by tissues. *Q.Jl.Exp.Physiol.*
28: 243-251.
- DONOSO, M.V. y HUIDOBRO-TORO, J.P. (1986):
Involvement of calcium channels in the contractile
activity of neurotensin but not acetylcholine: studies
with calcium channels blockers and BAY K 8644 on the
rat fundus. *Br.J.Pharmacol.* 88: 837.
- DOODS, H.N., MATHY, M.J., DAVIDESKO, D., VAN CHARLDORP,
K.J., de JONGE, A. y VAN ZWIETEN, P. (1987):
Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand
"in vivo" experiments for the putative M₁, M₂ and
M₃ receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 242, 1: 257-262.
- DUNHAM, E.T. y GLYNN, I.M. (1961):
Adenosine triphosphate activity and the active move-
ments of alkalil metal ions. *J.Physiol.* 156: 247-293.
- DUNLAP, K. y FISCHBACH, G.D. (1981):
Neurotransmitters decrease the calcium conductance
activated by depolarization of embryonic chick sensory
neurons. *J.Physiol. (Lond.)* 317: 519-535.

- DURBIN, R.P. y JENKINSON, D.H. (1961a):
The effect of carbachol on the permeability of depolarized smooth muscle to inorganic ions. J.Physiol. London 157: 74-89.
- DURBIN, R.P. y JENKINSON, D.H. (1961b):
The calcium dependence of tension development in depolarized smooth muscle. J.Physiol. London 157: 90-96.
- EBASHI, S. (1980):
Regulation of muscle contraction. Proc.R.Soc.Lond. B. 207: 259-286.
- ECKERT, R. y CHAD, J.E. (1984):
Inactivation of Ca^{++} channels. Prog.Biophys.Biol. 44: 215-267.
- EDMAN, K.A.P. y SCHILD, H.O. (1963):
Calcium and the stimulant and inhibitory effects of adrenaline on depolarized smooth muscle. J.Physiol. (Lond.) 169: 404-411.
- EHLERT, F.J. y YAMAMURA, H.I. (1984):
A comparison of the effects of cinnarizine and related compounds on [3H]nitrendipine binding in the brain, heart and ileum. Life Sci. 34: 2347-2355.
- EHLERT, F.J., ITOGA, E., ROESKE, W.R. y YAMAMURA, H.I. (1982):
The interaction of [3H]nitrendipine with receptors for calcium antagonists in the cerebral cortex and heart of rats. Biochem.Biophys.Res.Comm. 104: 937-943.
- ERMAN, R.D., YAMAMURA, H.I. y ROESKE, W.R. (1983):
Tomado de RANKUMAR y EL-FAKAHANY (1986).
- EVANS, D.H.L., SCHILD, H.O. y THESLEFF, S. (1958):
Effects of drugs of depolarized plain muscle. J.Physiol. (Lond.). 143: 474-485.
- FATT, P. y KATZ, B. (1953):
The electrical properties of crustacean muscle fibers. J.Physiol. London 120: 171-204.
- FELDBERG, W. y LIN, R.C.Y. (1949):
The effect of cocaine on the acetylcholine output of the intestinal wall. J.Physiol. 109: 475-487.
- FELDBERG, W. y LIN, R.C.Y. (1950):
Synthesis of acetylcholine in the wall of the digestive tract. J.Physiol. 11: 96-118.

- FERRY, D.R. y GLOSSMANN, H. (1982):
Evidence for multiplier receptor sites within the putative calcium channel. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 321: 80-83.
- FERRY, D.R. y GLOSSMANN, H. (1984):
¹²⁵I-iodipine a new high affinity ligand putative calcium channel. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 325: 186-189.
- FERRY, D.R., GLOSSMANN, H. y KAUMANN, A.J. (1985):
Relationship between the stereoselective negative inotropic of verapamil enantiomers and their binding to putative calcium channels in human heart. Br.J.Pharmacol. 84: 811-824.
- FERRY, D.R., GOLL, A. y GLOSSMANN, H. (1983a):
Differential labelling of putative skeletal muscle calcium channels by ³H|nifedipine, ³H|nitrendipine, ³H|nimodipine and ³H|PN-200-110. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 323: 276-277.
- FERRY, D.R., GOLL, A. y GLOSSMANN, H. (1983b):
Putative calcium channel molecular weight determination by target size analysis. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 323: 292-297.
- FERRY, D.R., GOLL, A., GADON, D. y GLOSSMANN, H. (1984):
³H|desmethoxyverapamil labelling of putative calcium channels in brain: autorradiographic distribution and allosteric coupling to 1,4-dihydropyridine and diltiazem binding sites. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 327: 183-187.
- FLAIM, S.F., RATZ, P.H., SWIGART, S.C. y GLEASON, M.M. (1985):
Bepredil hydrochloride alters potential-dependent and receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle of rabbit aorta. J.Pharmacol.Exp.Ther. 234: 63-71.
- FLECKENSTEIN, A. (1968):
Experimental heart failure due to disturbances in high energy phosphate metabolism. In Proceedings of the Fifth European Congress of Cardiology. Athens. Sept. pp. 255-269.
- FLECKENSTEIN, A. (1977):
Specific pharmacology of calcium myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 17: 149-166.

- FLECKENSTEIN, A. (1981):
Pharmacology and electrophysiology of calcium antagonists. In: Calcium antagonism cardiovascular therapy: experience with verapamil. Ed. A. Zanchetti and D.M. Krikler. Excerpta Médica, Amsterdam-Oxford-Princeton. pp. 10-29.
- FLOREZ, J., ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, A. (1980):
Mecanismos generales de acción de los fármacos. En Farmacología Humana. 5ª Edición. Ediciones Universidad de Navarra S.A. Pamplona (España) pp. 21-41.
- FORD, D.A., SHARP, J.A. y ROVETTO, M.J. (1985):
Erythrocyte adenosine transport: effect of Ca^{++} antagonists and ions. Am.J.Physiol. 248: H593-H598.
- FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E. y LAZDUNSKI, M. (1983):
 3H nitrendipine receptors in skeletal muscle. Properties and preferential localization in transverse tubules. J.Biol.Chem. 258: 6086-6092.
- FRANCKOWIAK, G., BECHEM, M., SCHRAMM, H. y THOMAS, G. (1985):
The optical isomers of 1,4 dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on the calcium channel. Eur.J. Pharmacol. 114: 223-226.
- GABELA, G. (1978):
Effect of potassium on the mechanical activity of taenia coli, uterus and portal vein of the guinea-pig. Q.J.Exp.Physiol. 63: 125-146.
- GAGGI, R. y GIANNI, A.M. (1990):
Effects of calcium antagonists on biogenic amines in discrete brain areas. Eur.J.Pharmacol. 181: 187-197.
- GALIZZI, J.P., BORSOTTO, M., BARHANIN, J., FOSSET, M. y LAZDUNSKI, M. (1986):
Characterization and photoaffinity labelling of receptor sites for the Ca^{++} channel inhibitor d-cis-diltiazem, (+/-) bepridil, desmethoxyverapamil and (+)-PN 200-110 in skeletal muscle transverse-tubule membranes. J.Biol.Chem. 261: 1393-1297.
- GALIZZI, J.P., FOSSET, M. y LAZDUNSKI, M. (1984):
Properties of receptors for the Ca^{++} channel blocker verapamil in transverse-tubule membranes of skeletal muscle. Eur.J.Biochem. 114: 211-215.

GARCIA, M.L., TRUMBLE, M.J., REUBEN, J.P. y KACZOROWSKI, G.J. (1984):

Characterization of verapamil binding sites in cardiac membranes vesicles. *J.Biol.Chem.* 259: 15013-15016.

GENGO, P.J., YOUSIF, F., JANIS, R.A. y TRIGGLE, D.J. (1984)
Interaction of phenoxybenzamine with muscarinic receptors and calcium channels. *Biochem.Pharmacol.* 33: 3445-3449.

GILLESPIE, J.S. y McGRATH, J. (1974):

The response of the cat anococcygeus muscle to nerve or drug stimulation and a comparison with the rat anococcygeus. *Br.J.Pharmacol.* 50: 109-118.

GLOSSMANN, H. y FERRY, D.R. (1985):

Assay for calcium channels. *Methods Enzymol.* 109: 513-551.

GLOSSMANN, H., FERRY, D.R. y BOSCHEK, C.B. (1983a):

Purification of the putative calcium channel from skeletal muscle with the aid of ^3H nimodipine binding. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 323: 1-11.

GLOSSMANN, H., FERRY, D.R., LUBBECKE, F., NEWES, R. y HOFFMANN, F. (1982):

Calcium channels: direct identification with radioligand binding studies. *Trends Pharmacol.Sci.* 3: 431-437.

GLOSSMANN, H., GOLL, A., ROMBUSCH, M. y FERRY, D.R. (1985):
Molecular pharmacology of Ca^{++} channels receptor binding studies. In: *Nimodipine pharmacological and clinical properties.* Ed. E. Betz, K. Deck y F. Hoffmeister. Schattauer. Verlag. Stuttgart. pp. 57-73.

GLOSSMANN, H., LINN, T., ROMBUSCH, M. y FERRY, D.R. (1983b):
Temperature-dependent regulation of d-cis- ^3H diltiazem binding to Ca^{++} channel by 1,4-dihydropyridine channel agonists and antagonists. *FEBS Lett.* 160: 226-232.

GODFRAIND, T. (1981):

Mechanism of action of calcium entry blockers. *Fed. Proc.* 40: 2866-2871.

GODFRAIND, T. y KABA, A. (1969):

Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine on the contraction induced by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 35: 354P-355P.

- GODFRAIND, T., MILLER, R. y WIBO, M. (1986):
Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol.Rev.* 38(4): 324-393.
- GODFRAIND, T., STURBOIS, X. y VERBEKE, N. (1976):
Calcium incorporation by smooth muscle microsomes. *Biochem.Biophys.Acta* 455: 254-268.
- GODFRAIND, T. y WIBO, M. (1985):
Subcellular localization of [³H]nitrendipine binding sites in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 85: 335-340.
- GODFRAIND-DE BECKER, A. y GODFRAIND, T. (1980):
Calcium transport system: a comparative study in different cells. *Int.Rev.Cytol.* 67: 141-170.
- GOLENHOFEN, K. (1976):
Theory of P and T systems for calcium activation in smooth muscle. In *Physiology of smooth muscle*. ed. by E. Bülbbring and M.F. Shuba. Raven Press, New York. pp. 197-202.
- GOLENHOFEN, K. y LAMMEL, E. (1972):
Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by iproveratril (Verapamil). *Pfluegers Arch.* 331: 233-243.
- GOLL, A., FERRY, D.R. y GLOSSMANN, H. (1984):
Target size analysis and molecular properties of Ca⁺⁺ channels labelled with, [³H]verapamil. *Eur.J.Biochem.* 141: 177-186.
- GOLL, A., FERRY, D.R. y GLOSSMANN, H. (1983):
Target size analysis of skeletal muscle Ca⁺⁺ channels. Positive allosteric heterotropic regulation by d-cis-diltiazem is associated with apparent channel oligomer dissociation. *FEBS Lett.* 157: 63-69.
- GOODMAN, F.R. y WEISS, G.B. (1971):
Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. *Am.J.Physiol.* 220(3): 759-766.
- GOVONI, S., RIUS, R.A., BATTAINI, F., BIANCHI, A. y TRABUCCHI, M. (1985):
Tomado de RANKUMAR y EL-FAKAHANY (1986).
- GOULD, R.J., MURPHY, K.M.M., REINOLDS, I.J. y SNYDER, S.H. (1983):
Antischizophrenic drugs of the diphenylbutylpiperidine

type act as calcium channel antagonists. Proc.Natl. Acad.Sci. USA. 80: 5122-5125.

- GOULD, R.J., MURPHY, K.M.M. y SNYDER, S.H. (1982):
|³H|nitrendipine-labelled calcium channel discriminate inorganic calcium agonist and antagonist. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 79: 3656-3660.
- GOULD, R.J., MURPHY, K.M.M. y SNYDER, S.H. (1984):
Tissue heterogeneity of calcium channel antagonist binding sites labelled by |³H|nitrendipine. Mol.Pharmacol. 25: 235-241.
- GOULD, R.J., MURPHY, K.M.M. y SNYDER, S.H. (1985):
Autoradiographic localization of calcium channel antagonist receptors in rat brain with |³H|nitrendipine. Brain Res. 330: 217-223.
- GRBOVIC, L. y RADMANOVIC, Z. (1987):
The effect of nifedipine on the contractile responses of the longitudinal and circular muscle of the isolated guinea-pig ileum to various agonists. Arch.Int. Pharmacodyn. 289: 165-176.
- GREBB, J.A. (1986):
Nifedipine and flunarizine block amphetamine-induced behavioural stimulation in mice. Life Sci. 38: 2375-2381.
- GREEN, F.J., FARMER, B.B., WISEMAN, G.L., JOSE, M.J.L. y WATANABE, A. (1985):
Effect of membrane depolarization on binding of |³H|nitrendipine to rat cardiac myocytes. Circ.Res. 56: 576-585.
- GREENBERG, D.A., CARPENTER, C.L. y MESSING, R.O. (1985a):
Inactivation of Ca²⁺ uptake by prior depolarization of PC12 cells. Neurosci.Lett. 62: 377-381.
- GREENBERG, D.A., COOPER, E.C. y CARPENTER, C.L. (1985b):
Reversible dihydropyridine isothiocyanate binding to brain calcium channels. J.Neurochem. 44: 319-321.
- GREENGARD, P. (1978):
Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science, N.Y. 199: 146-152.
- GROVER, A.K., KWAN, C.Y., LUCHOWSKI, E., DANIEL, E.E. y TRIGGLE, D.J. (1984):
Subcellular distribution of |³H|nitrendipine binding in smooth muscle. J.Biol.Chem. 259: 2223-2226.

- GROVER, A.K. y OAKES, P.J. (1985):
Calcium channel antagonist binding and pharmacology
in rat uterine smooth muscle. *Life Sci.* 37: 2187-2192.
- GUYTON, A.C. (1987):
Histología del músculo liso. En *Tratado de Fisiología Médica* 6. Ed. Editorial Interamericana (México D.F.)
pp. 172-183.
- HAEUSLER, G. (1972):
Differential effects of verapamil on excitation-con-
traction coupling in smooth muscle and on excitation-
secretion coupling in adrenergic nerve terminales.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 180: 672-682.
- HAGIWARA, S. (1973):
Ca²⁺ spike. *Adv.Biophys.* 4: 71-102.
- HAMON, G. y WORCEL, M. (1974):
Changes in ionic fluxes in uterine smooth muscle in-
duced by carbachol. *Br.J.Pharmacol.* 52: 119P.
- HARDER, D.R. y SPERELAKIS, N. (1979):
Action potentials induced in guinea-pig arterial
smooth muscle by tetraethylammonium. *Am.J.Physiol.*
237: C75-C80.
- HARTSHORNE, D.J. y SIEMANKOV, R.F. (1981):
Regulation of smooth muscle actomyosin. *Ann.Rev.Physiol.*
43: 519.
- HAYASHI, E., KUNITOMO, M., MORI, M., SHINOZUKA, K. y YAMA-
DA, S. (1978):
The development of tachyphylaxis to electrical stimu-
lation in guinea-pig ileal longitudinal muscle and
the possible participation of adenosine and adenine
nucleotides. *Br.J.Pharmacol.* 63: 457.
- HAYASHI, E., MAEDA, T. y SHINOZUKA, K. (1985):
Adenosine and dipyridamole: actions and interactions
on the contractile response of guinea-pig ileum to
high frequency electrical field stimulation. *Br.J.Pharmacol.* (in press).
- HAYASHI, E., YAMADA, S. y SHINOZUKA, K. (1981):
The influence of extracellular Ca⁺⁺ concentration on
the inhibitory effect of adenosine in guinea-pig ileal
longitudinal muscles. *Jap.J.Pharmacol.* 31: 141.

- HEILBRUNN, L.V. y WIERCINSKI, F.J. (1947):
The action of various cations on muscle protoplasm.
J.Cell.Comp.Physiol. 29: 15-32.
- HERMAN, A.G., BOGAERT, M.G. y DE SCHAEPPDRYVER, A.F. (1971):
Nitroglycerol on the isolated ear artery of the rabbit.
Pharmacology 6: 145-154.
- HERSMEYER, K. (1983):
Nitrendipine and hyperpolarization of arterial muscle.
In: Nitrendipine. ed. by A. Scriabine, S. Vanov and K. Deck. pp. 161-166. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.
- HESS, P., LANSMAN, J.B. y TSIEN, R.W. (1984):
Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. Nature (Lond.) 311: 538-544.
- HIGUCHI, S. y SHIOBARA, Y. (1978):
Quantitative determination of nifedipine in human plasma by selecting ion monitoring. Biomed.Mass.Spectrom. 5: 220-223.
- HILLE, B. (1977):
Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. J.Gen.Physiol. 69: 497-515.
- HILL-SMITH, I. y PURVES, R.D. (1978):
Synaptic delay in the heart: an ionophoretic study. J.Physiol. London 279: 31-54.
- HINKE, J.A.M. (1965):
Calcium requirements for noradrenaline and high potassium ion contraction in arterial smooth muscle. In Muscle (Paul, W.M., Daniel, E.E., Kay, C.M. Monekton, G. eds.) Oxford: Pergamon. pp. 269-284.
- HIRATA, M. y INAMITSU, T. (1983):
Effect of diltiazem on the release of calcium from the canine fragmented cardiac sarcoplasmic reticulum. Jpn.J.Pharmacol. 33: 991-997.
- HIRATA, M., OTOH, T. y KURIYAMA, H. (1981):
Effects of external cations of calcium efflux from single cells of guinea-pig taenia coli and porcine coronary artery. J.Physiol. London 117: 500-544.
- HIRATA, M., SUEMATSU, E., HASHIMOTO, T., HAMACHI, T. y KODA T. (1984):

Release of Ca^{++} from a non mitochondrial store site in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1,4,5 triphosphate. *Biochem.J.* 223: 229-236.

HIRNING, L.D., FOX, A.P., McCLESKY, E.W., OLIVERA, B.M., THAYER, S.A., MILLER, R.J. y TSIEN, R.W. (1988):
Dominant role of N-type Ca^{++} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239: 57-61.

HODGSON, B.J. y DANIEL, E.E. (1972):
The effects of excitatory drugs on potassium fluxes in uterine smooth muscle. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 50: 725-730.

HOFFMEISTER, F., BENZZ, U. y HEISE, A. (1982):
Behavioural effects of nimodipine in animals. *Arch. Forsch.Drug Res.* 32: 247-260.

HOFFMEISTER, F. y TETTENBORN, D. (1986):
Calcium agonists and antagonists of the dihydropyridine type. Antinociceptive effects, interference with opiate-u-receptor agonists and neuropharmacological actions in rodents. *Psychopharmacology* 90: 299-307.

HOLCK, M., THORENS, S. y HAEUSLER, G. (1982):
Characterization of [3H]nifedipine binding sites in rabbit myocardium. *Eur.J.Pharmacol.* 85: 305-315.

HOLMAN, M.E. (1958):
Membrane potentials recorded with high resistance micro-electrodes: and the effects of changes in ionic environment on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle of the taenia coli of the guinea-pig. *J.Physiol. London* 141: 464-488.

HONDEGHEM, L.M. y KATZUNG, B.G. (1977):
Time and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim.Biophys.Acta* 472: 373-398.

HORNE, P., TRIGGLE, D.J. y VENTER, J.C. (1984):
Nitrendipine and isoproterenol induce phosphorylation of a 42.000 dalton protein that comigrates with the affinity labelled calcium channel regulatory subunit. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 121: 8909-898.

HUDGINS, P.M. y 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.

- HUKUHARA, T. y FUKUDA, H. (1968):
The electrical activity of guinea-pig small intestine with special reference to the slow wave. *Jpn.J.Physiol.* 18: 71-86.
- HURWITZ, L. (1960):
Potassium transport in isolated guinea-pig ileum. *Am. J.Physiol.* 198: 94-98.
- HURWITZ, L., MCGUFFE, L.J., LITTLE, S.A. y BLUMBERG, H. (1980):
Evidence for two distinct types of potassium-activated calcium channels in a intestinal smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 214: 574-580.
- IKUSHIMA, S., MURAMATSU, I. y FUJIWARA, M. (1981):
Effects of 4-aminopyridine on the adrenergic nerve terminals of rabbit's arteries. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 219: 792.
- ILDEFONSE, M., JACQUEMOND, V., ROUVIER, O., RENAUD, J.F., FOSSET, M. y LAZDUNSKI, M. (1985):
Excitation-contraction coupling in skeletal muscle; evidence for a role of slow Ca^{++} channels using Ca^{++} channel activators and inhibitors in the dihydropyridine series. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 129.
- IMAI, S. y TAKEDA, K. (1967):
Actions of calcium and certain multivalent cations on potassium contracture of guinea-pig's taenia coli. *J.Physiol. London* 190: 155-169.
- INGENITO, A.J. (1985):
Relative activities of three calcium channel antagonists on histamine, acetylcholine and antigen-induced contractions of guinea-pig ileum. *Agents Actions* 17: 113-120.
- ITO, Y. y KURIYAMA, H. (1971):
The properties of the rectal smooth muscle membrane of the guinea-pig in the relation to the nervous influences. *Jpn.J.Pharmacol.* 221: 277-294.
- ITO, Y. y KURIYAMA, H. (1973):
Membrane properties and inhibitor innervation of the circular muscle cells of guinea-pig caecum. *J.Physiol. London* 233: 455-470.
- ITO, Y. y KURIYAMA, H. (1974):
Effects of thymol on the electrical and mechanical properties of the guinea-pig taenia coli. *J.Physiol. London* 236: 143-157.

- ITOH, T., KANMURA, Y., KURIYAMA, H. y SUZUKI, H. (1984):
Nisoldipine-induced relaxation in intact and skinned smooth muscles of rabbit coronary arteries. Br.J.Pharmacol. 83: 243-258.
- JACKOBSEN, P., PEDERSEN, O.L. y MIKKELSEN, E. (1979):
Gas chromatographic determination of nifedipine and one of its metabolites using electro capture detection. J.Chromatogr. 162: 81-87.
- JANIS, R.A., RAMPE, D., SARMIENTO, J.G. y TRIGGLE, D.J. (1984 a):
Specific binding of a calcium channel activator, [³H] BAY K 8644 to membranes from cardiac muscle and brain. Biochem.Biophys.Res.Comm. 121: 317-323.
- JANIS, R.A., SARMIENTO, J.G., MAURER, S.C., BOLGER, G.T. y TRIGGLE, D.J. (1984 b):
Characteristics of the binding of [³H]nitrendipine to rabbit ventricular membranes: modification by other Ca⁺⁺ channel antagonists and by the Ca⁺⁺ channel agonist BAY K 8644. J.Pharmacol.Exp.Ther. 231: 8-15.
- JANIS, R.A. y SCRIBABINE, A. (1983):
Sites of action of Ca⁺⁺ channels inhibitors. A.Biochem Pharmac. 32: 3499-3507.
- JOHNSON, E.S. (1963):
The origin of acetylcholine released spontaneously from the guinea-pig isolated ileum. Br.J.Pharmacol. Chemother. 21: 555-568.
- JOHNSON, J.D. (1984):
A calmodulin-like Ca⁺⁺ receptor in the Ca⁺⁺ channel. Biophys.J. 45: 134-136.
- JOINER, P.D. (1973):
Studies on the loss of acetylcholine sensitivity in ileal muscle. J.Pharmacol.Exp.Ther. 186: 552-561.
- KAMADA, T. y KINOSITA, H. (1943):
Disturbances initiated from naked surface of muscle protoplasm. Jpn.J.Zool. 10: 469-493.
- KANN, J., KROL, G.J., RAMSCH, K.D., BURKHOLDER, D.E. y LEVITT, M.J. (1984):
Bioequivalence and metabolism of nitrendipine administered orally to healthy volunteers. J.Cardiovasc.Pharmacol. 6: 968-973.

KASS, R.S. (1982):

Nisoldipine: A new more selective calcium current blocker in cardiac Purkinje fibers. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 223: 446-456.

KASS, R.S., ARENA, J.P. y WIENER, R.S. (1987):

Membrane potential and nisoldipine block of calcium channels in the heart: interactions with channel gating. In: *Nisoldipine 1987*. Ed. P.G. Hugenholtz y J. Meyer. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg 1987. pp. 13-26.

KATZ, B. y MILEDI, R. (1970):

Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J.Physiol. (Lond.)*. 207: 789-801.

KAUFFMAN, R., BAYER, R., RODENKIRCHEN, P. y MANNHOLD, R. (1982):

Differentiation of calcium antagonistic drugs with respect to their myocardial effects. In: *Hypertrophic cardiomyopathy*. Ed. M. Kaltenbach and S. Epstein. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pp. 276-284.

KAVALIERS, M. (1987):

Calcium channel blockers inhibit the antagonistic effect of Phe-Met-Arg-Phe-amide (FMRF amide) on morphine and stress-induced analgesia in mice. *Brain Res.* 415: 380-384.

KAZAZOGLU, t., SCHMID, A., RENAUD, J.F. y LAZDUNSKI, M. (1983):

Tomado de RANKUMAR y EL-FAKAHANY (1986).

KAZDA, S., KANORR, A. y TOWART, R. (1983):

Common properties and difference between various calcium antagonists. *Progress in Pharmacology*. Vol. 5, 2: 83-116.

KAZDA, S. y TOWART, R. (1982):

Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. *Acta Neurochir.* 63: 259-265.

KENDALL, D.A. y NAHORSKI, S.R. (1985):

Dihydropyridine calcium channel activators and antagonists influence depolarization evoked inositol phospholipid hydrolysis in brain. *Eur.J.Pharmacol.* 115: 31-36.

KILBINGER, H. (1984):

Presynaptic muscarine receptors modulating acetylcho-

line release. Trends Pharmacol.Sci. 5: 103-105.

- KILBINGER, H. y NAFZINGER, M. (1985):
Two types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 328: 304-309.
- KIRKPATRICK, C.T., JENKINSON, H.A. y CAMERON, A.R. (1975):
Interaction between drugs and potassium-rich solutions producing contraction in bovine tracheal smooth muscle: studies in normal and calcium-depleted tissues. Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. 2: 559-570.
- KLEINBLOESEM, C.H., VAN BRUMMELEN, P., VAN de LINDE, J.A., VOOGD, P.J. y BREIMER, D.D. (1984):
Nifedipine: kinetics and dynamics in healthy subjects. Clin.Pharmacol.Ther. 35,6: 742-749.
- KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H. y FLECKENSTEIN, A. (1972):
Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibers by the use of specific inhibitors. Pflugers Arch.Eur.J.Physiol. 335: 309-322.
- KOKETSU, K., NISHI, S. y SOEDA, H. (1968):
Acetylcholine-potential of sympathetic ganglion cell membrane. Life Sci. 7: 741-749.
- KOKUBUN, S. y REUTER, H. (1984):
Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. Proc.Natl. Acad.Sci. USA 81: 4824-4827.
- KOSTERLITZ, H.W., LYDON, R.J. y WATT, A.J. (1970):
The effect of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory alpha- and beta-adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. Br.J. Pharmacol. 39: 398-413.
- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K.Z. (1932):
Untersuchungen über die harnstoff bildung in Tierkörper. Hoppeseyler's Z.J. Physiol.Chem.Ithaca 210: 33.
- KROL, G.J., LETTIERI, J.T., YEH, S.C., BURKHOLDER, D.E. y BIRKETT, J.P. (1988):
Distribución y farmacocinética de ¹⁴C-nitrendipino en voluntarios sanos. J.Cardiovasc.Pharmacol. 9(suppl. 4): S128-S143.

- KUHLMANN, J., GRAEFE, K.H., RÄMSCH, K.D. y ZIEGLER, R. (1986):
Clinical pharmacology of nifedipine. In: Treatment of cardiovascular disease by Adalat^R (Nifedipine). ed. by R. Krebs, R. Wuppertal. Stuttgart-New York. pp. 107-144.
- KULLAK, A., DONOSO, V. y HUIDOBRO-TORO, J.P. (1987):
Extracellular calcium dependence of neurotensin induced relaxation of intestinal smooth muscles: studies with calcium channel blockers and BAY K 8644. Eur.J. Pharmacol. 135: 297-305.
- KURIYAMA, H. (1963):
The influence of potassium, sodium and chloride on the membrane potential of smooth muscle of taenia coli. J.Physiol. London 166: 15-28.
- KURIYAMA, H., MISHIMA, K. y SUZUKI, H. (1975):
Some differences in contractile responses of isolated longitudinal and circular muscle from the guinea-pig stomach. J.Physiol. London 251: 317-331.
- KURIYAMA, H., OHSHIMA, K. y SAKAMOTO, Y. (1971):
The membrane properties of the smooth muscle of the guinea-pig portal vein in isotonic and hypertonic solutions. J.Physiol. London 217: 179-199.
- KURIYAMA, H., OSA, T., ITO, Y., SUZUKI, H. y MISHIMA, K. (1976):
Topical differences in excitation and contraction between guinea-pig stomach muscles. In Physiology of smooth muscle. ed. E. Bülbbring and M.F. Shuba. New York: Raven pp. 185-196.
- KURIYAMA, H., OSA, T. y TOIDA, N. (1967):
Nervous factors influencing the membrane activity of intestinal smooth muscle. J.Physiol. London 191: 257-270.
- KURIYAMA, H. y SUZUKI, H. (1978):
The effects of acetylcholine on the membrane and contractile properties of smooth muscle cells of the rabbit superior mesenteric artery. Br.J.Pharmacol. 64: 493-501.
- KNAN, Y.F., SCHOLFIELD, C.N. y STEEL, N. (1985):
Effect of Ca⁺⁺ antagonists on axonal Ca⁺⁺/Ba⁺⁺ spikes in slices of guinea-pig brain. J.Physiol. (London) 362: 38P.
- LAMMEL, E. (1977):
⁴⁵Ca-uptake of stomach smooth muscle during differing modes of activation. In: Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle. ed. R. Casteels, T. Godfraind and C. Rüegg. Amsterdam: Elsevier. pp. 273-277.

- LAWSON, K. y CAVERO, I. (1989):
Contractile responses to calcium chloride in rat aortic rings bathed in K^+ -free solution are resistant to organic calcium. Br.J.Pharmacol. 96: 17-22.
- LEE, H.R., ROESKE, W.R. y YAMAMURA, H.I. (1984):
High affinity specific [3] (+)PN-200-110 binding to dihydropyridine receptors associated with calcium channels in rat cerebral cortex and heart. Life Sci. 35: 721-732.
- LEE, K.S. y TSIEN, R.W. (1983):
Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D-600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. Nature (London) 302: 790-794.
- LEMBECK, F. y STROBACH, R. (1956):
Kaliumabgabe aus glatter Muskulatur. Arch.Exp.Pathol. Pharmakol. 228: 130-131.
- LINCOLN, T.M. (1983):
Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. J.Pharmacol Exp.Ther. 224: 100-107.
- LINDNER, E., RUPPERT, D. y KAISER, J. (1984):
Hoe 263, a new substance with calcium channel agonistic activity. Pharmacology 29: 165-172.
- LLINAS, R.P. (1982):
Calcium in synaptic transmission. Sci.Am. 242: 56-65.
- LORENZ, R.R. y VANHOUTTE, P.M. (1975):
Inhibition of adrenergic neurotransmission in isolated veins of the dogs by potassium ions. J.Physiol. London 246: 479-500.
- LUCHOWSKI, E.M., YOUSIF, F., TRIGGLE, D.J., MAURER, S.C., SARMIENTO, J.G. y JANIS, R.A. (1984):
Effects of metal cations and calmodulin antagonists on [3 H]nitrendipine binding in smooth and cardiac muscle. J.Pharmacol.Exp.Ther. 230: 607-613.
- MacDONALD, R.L., SKERRITT, J.H. y WERZ, M.A. (1986):
Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell cultures. J.Physiol. (Lond.) 370: 75-90.
- MAGNUS, R. (1904):
Versechu am überlebendem Dünudarum vos Sauügetieren III Die Erregungsleitung. Pflügers Arch.Ges.Physiol. 103: 515-524.

- MALAISSSE, W.J., SENER, A. y MALAISSSE-LAGAE, F. (1985):
Combined effects of a calcium agonist and hypoglycemic
or hyperglycemic sulfonamides upon insulin release.
Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 49: 71-83.
- MALAISSSE-LAGAE, F., MATHIAS, P.C.F. y MALAISSSE, W.J. (1984)
Gating and blocking of calcium channels by dihydropy-
ridines in the pancreatic beta-cell. Biochem.Biophys.
Res.Comm. 123: 1062-1068.
- MALTA, E., RAPER, C. y TAWA, P.E. (1981):
Pre and postjunctional effects of clonidine and oxyme-
tazoline-like compounds in guinea-pig ileal prepara-
tions. Br.J.Pharmacol. 73: 355-362.
- MANDEHOLD, R., RODENKIRCHEN, R. y BAYER, R. (1982):
Qualitative and quantitative structure-activity rela-
tionship of specific Ca^{++} antagonists. Prog.Pharmacol.
5: 25-52.
- MARANGOS, P.J., PATEL, J., MILLER, C. y MARTINO, A.M. (1982)
Specific calcium antagonist binding sites in brain.
Life Sci. 31: 1575-1585.
- MARCHETTI, C., CARBONE, E. y LUX, H.D. (1986):
Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels
of cultured sensory and sympathetic neurons of chick.
Pflügers Arch. 406: 104-111.
- MARSH, J.D., LOH, E., LACHANCE, D., BARRY, W.H. y SMITH,
T.W. (1983):
Relationship of binding of a calcium channel blocker
to inhibition of contraction in intact cultured embrio-
nic chick ventricular cells. Circ.Res. 53: 539-543.
- MARTIN, M.I., ALFARO, M.J. y TAMARGO, J. (1988):
Effect of oxodipine and nifedipine on guinea-pig
ileum. Gen.Pharmacol. 19: 771-774.
- MAY, C.N. y PEART, W.S. (1985):
Effect of the calcium agonist BAY K 8644 on "in vitro"
renin release from rat kidney cortex. J.Physiol. (Lon-
don) 360: 56P.
- MEREDITH, P.A., ELLIOT, H.L. y REID, J.L. (1988):
The clinical pharmacology of nisoldipine: studies on
the pharmacokinetics and interactions with beta-blo-
ckers. In: Recent aspects in calcium antagonism: Nisol-
dipine. Ed. Lichtten y Hugenholtz. Schttauer. Stutt-
gart-New York 1988. pp. 12-21.

- MESSIN, R.O., CARPENTER, C.L. y GREENBERG, D.A. (1985):
Mechanism of calcium channel inhibition by phenytoin:
comparison with classical calcium channel agonists.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 235: 407-411.
- MEYER, F.B. (1989):
Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury.
Brain Res.Rev. 14: 227-243.
- MEYER, H., SCHERLING, D. y KARL, W. (1983a):
Nitrendipine: Identification and synthesis of main
metabolites. Arz.Forsch Drug Res. 33(II) Nr. 11: 1528-
1534.
- MEYER, H., WEHINGER, E., BOSSERT, F. y SCHERLING, D. (1983b):
Nisoldipine: synthesis and metabolic pathway. Arz.
Forsch.Drug Res. 33(I), nº 1: 106-112.
- MIDDLEMISS, H. y SPEDDING, M. (1985):
A functional correlate for the dihydropyridine binding
site in rat brain. Nature 34: 94-96.
- MILANES, M.V., MARTINEZ, J.A. y VARGAS, M.L. (1989):
Influence of dopaminergic and noradrenergic systems
on the release of opioid peptides in guinea-pig ileum.
J.Pharm.Pharmacol. 41: 607-611.
- MILLER, R.J. y FREEDMAN, S.B. (1984):
Are dihydropyridine binding sites voltage-sensitive
calcium channels? Life Sci. 34: 1205-1221.
- MITCHELSON, F. y ZIEGLER, A. (1984):
The effect of Gallamine, Gallopamil and Nifedipine
on responses to acetylcholine and carbachol in the
taenia of the guinea-pig caecum. Br.J.Pharmacol. 83:
145-155.
- MO, N., AMMARI, R. y DUN, N.J. (1985):
Prostaglandin E₁ inhibits calcium-dependent potentials
in mammalian sympathetic neurons. Brain Res. 334: 325-
329.
- MOGILNICKA, E., CZYRAK, A. y MAJ, J. (1987):
BAY K 8644 enhances immobility in the mouse behaviour-
al despair test, an effect blocked by nifedipine.
Eur.J.Pharmacol. 151: 307-311.
- MOREL, N. y GODFRAIND, T. (1982):
Na-Ca exchange in heart and smooth muscle microsomes.
Arch.Pharmacodyn.Ther. 258: 319-321.

- MOREL, N. y GODFRAIND, T. (1984):
Na-Ca exchange in smooth muscle microsomes. *Biochem.J.* 218: 421-427.
- MOREL, N., WIBO, M. y GODFRAIND, T. (1981):
A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in rat aorta plasma membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 644: 82-88.
- MORITA, K., NORTH, R.A. y TOKIMASA, T. (1982a):
Muscarinic agonists inactivate potassium conductance of guinea-pig myenteric neurones. *J.Physiol.* 333:125-139.
- MORITA, K., NORTH, R.A. y TOKIMASA, T. (1982b):
Muscarinic presynaptic inhibition of synaptic transmission in myenteric plexus of guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 333: 141-149.
- MUNRO, A.F. (1953):
Effects of autonomic drugs on the responses of isolated preparations from the guinea pig intestine to electrical stimulation. *J.Physiol.* 120: 41-52.
- MURASE, K., RYU, P.D. y RANDIC, M. (1986):
Substance P augments a persistent slow inward calcium sensitive current voltage clamped spinal dorsalhorn neurons of the rat. *Brain Res.* 365: 369-376.
- MURPHY, K.H.M., GOULD, R.J. y SNYDER, S.H. (1982):
Autoradiographic visualization of [3H]nitrendipine binding sites in rat brain: localization to synaptic zones. *Eur.J.Pharmacol.* 81: 517-519.
- MURPHY, K.M.M., GOULD, R.J., LARGENT, B.L. y SNYDER, S.H. (1983):
A unitary mechanism of calcium antagonist drug action. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80: 860-864.
- NASU, T. y URAKAWA, N. (1973):
Effect of cholinergic drugs on calcium movement in guinea-pig taenia coli. *Jpn.J.Pharmacol.* 24: 553-561.
- NAYLER, W.G. y POOLE-WILSON, P. (1981):
Calcium antagonists. Definition and mode of action. *Basic Res.Cardiol.* 76: 1-15.
- NILIUS, B., HESS, P., LANSMAN, J.B. y TSIEN, R.W. (1985):
A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature (Lond.)* 316: 443-446.
- NISHI, S. y NORTH, R.A. (1973):
Intracellular recording from the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *J.Physiol.* 231: 471-491.

- NISHIYAMA, A. y PETERSEN, O.H. (1975):
Pancreatic acinar cells: ionic dependence of acetylcholine-induced membrane potential and resistance change. *J.Physiol. London* 244: 431-465.
- NOHMI, M., SHINNICK-GALLAGHER, P., GEAN, P.W., GALLAGHER, J.P. y COOPER, C.W. (1986):
Calcitonin and calcitonin gene related peptide enhance calcium-dependent potentials. *Brain Res.* 367: 346-350.
- NORMAN, R.I., BORSOTTO, M., FOSSET, M., LAZDUNSKI, M. y ELLORY, J.C. (1983):
Determination of the molecular size of nitrendipine sensitive- Ca^{++} -channel by radiation inactivation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 111: 878-883.
- NOWYCKY, M.C., FOX, A.P. y TSIEN, R.W. (1985):
Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (Lond.)* 316: 440-443.
- OHASHI, H. y OHGA, A. (1967):
Transmission of excitation from the parasympathetic nerve to the smooth muscle. *Nature* 216: 291-292.
- OHNISHI, T., KIHACHI, S., MATSUMOTO, K., SAKUDA, M. y INOKI R. (1988):
Decrease in analgesia effect of nifedipine following chronic morphine administration. *Eur.J.Pharmacol.* 158: 173-175.
- OSA, T. (1973):
The inhibitory action of caffeine on the smooth muscle of mouse myometrium and guinea-pig ileum. *Jpn.J.Physiol.* 23: 199-216.
- OSA, T. y KURIYAMA, H. (1975):
Electrophysiological and mechanical investigations on the dual action of prostaglandin E_1 in the pregnant rat myometrium in vitro. *Jpn.J.Physiol.* 25: 357-369.
- OSTERRIEDER, W., BRUM, G., HESCHELER, J. y TRAUTWEIN, W. (1982):
Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current. *Nature (Lond.)* 298: 576-578.
- PAN, M. y JANIS, R.A. (1984):
Stimulation of Na^+/K^+ -ATPase of isolated smooth muscle membranes by the Ca^{++} channel inhibitors, nimodipine and nitrendipine. *Biochem.Pharmacol.* 33: 787-791.

- PATON, W.D.M. (1955):
The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *J.Physiol.* 127: 40-41P.
- PATON, W.D.M. (1957):
The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 12: 119-127.
- PATON, W.D.M. (1964):
Electron microscopy of the smooth muscle and nerve networks of guinea-pig ileum. *J.Physiol.* 173: 20P.
- PATON, W.D.M. y ABOO-ZAR, M. (1968):
The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J.Physiol.* 194: 13-33.
- PATON, W.D.M., VIZZI, E.S. y ABOO-ZAR, M. (1971):
The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves. *J.Physiol.* 395: 441-543.
- PETERSEN, E.N. (1986):
BAY K 8644 induces a reversible spasticity-like syndrome in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 130: 323.
- PFTIZER, G., HOFMAN, F., DISALVO, J. y RUEGG, J.C. (1984):
cGMP and cAMP inhibit tension development in skinned coronary arteries. *Pflügers Arch.* 401: 277-280.
- PIETTA, P., RAVA, A. y BIONDI, P. (1981):
High performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *J.Chromatogr.* 210: 516-521.
- PILEBLAD, E. y CARLSSON, A. (1987):
The Ca⁺⁺ antagonist nimodipine decreases and the Ca⁺⁺ agonist BAY K 8644 increases catecholamine synthesis in mouse brain. *Neuropharmacology* 26: 101-105.
- PLOTTER, Y. y ATLAS, D. (1983):
Characterization of benextramine as an irreversible alfa-adrenergic blocker of potassium activated calcium channels. *Eur.J.Biochem.* 133: 539-544.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A. y JALFRE, M. (1977):
Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 229: 327.

- PUIG, M.M., GASCON, P., CRAVISO, G.L. y MUSACCHIO, J.M. (1977):
Endogens opiate receptor liquid: electrically induced release in the guinea-pig ileum. *Science* 195: 419-420.
- PURVES, R.D. (1976):
Function of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. *Nature (London)* 261: 149-150.
- RÄMSCH, K.D. y SOMMER, J. (1983):
Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine. *Hypertension* 5 Suppl. II: 18-24.
- RÄMSCH, K.D., GRAEFE, K.H., SCHERLING, D., SOMMER, J. y ZIEGLER, R. (1986):
Pharmacokinetics and metabolism of calcium -blocking agents nifedipine, nitrendipine and nimodipine. *Am.J. Nephrol.* 6: Suppl. 1: 73-80.
- RANKUMAR, V. y EL-FAKAHANY, E.E. (1986):
The current status of the dihydropyridine calcium channel antagonist binding sites in the brain. *TIPS* 171-172.
- RATZ, P.H. y FLAIM, S.F. (1985):
Acetylcholine and 5-hydroxytryptamine stimulated contraction and calcium uptake in bovine coronary artery: evidence of two populations of receptor-operated calcium channels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 234: 641-647.
- RENGASAMY, A., PTASIENSKI, J. y HOSEY, M.M. (1985):
Purification of the cardiac 1,4-dihydropyridine receptor-calcium channel complex. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 126: 1-7.
- REPKE, K. (1965):
Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. *Proc. 2nd Internat.Pharmacological Meeting*, vol. 4. pp. 65-86, ed. Brodie, B.B. y Gillette, J.R. London: Pergamon Press.
- REUTER, H. (1973):
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 26: 1-43.
- RICHELSON, E. y EL-FAKAHANY, E. (1981):
The molecular basis of neurotransmission at the muscarinic receptor. *Biochem.Pharmacol.* 30: 2887-2892.
- ROBERTSON, P.A. (1960):
Calcium and contractility in depolarized smooth muscle. *Nature (London)* 186: 316-317.

- RODENKIRCHEN, R., BAYER, R. y MANNHOLD, R. (1982):
II specific and nonspecific Ca^{++} antagonists. A structure-activity analysis of cardiodepressive drugs. *Prog Pharmacol.* 5: 9-23.
- ROSEMBERGER, L.B., TICKU, M.K. y TRIGGLE, D.J. (1979):
The effects of Ca^{++} antagonist on mechanical responses and Ca^{++} movements in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Can.J.Physiol.Pharmac.* 57: 333-347.
- SAIDA, K. y VAN BREEMEN, C. (1984):
Cyclic AMP modulation of adrenoceptor-mediated arterial smooth muscle contraction. *J.Gen.Physiol.* 84: 307-318.
- SANGUINETTI, M.C. y KASS, R.S. (1984):
Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ.Res.* 55: 336-348.
- SARMIENTO, G.J., JANIS, R.A., COLVIN, R.A., TRIGGLE, D.J. y KATZ, A. (1983):
Binding of the calcium channel blocker nitrendipine to its receptor in purified sarcolemma from canine cardiac ventricle. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 15: 135-137.
- SARMIENTO, G.J., JANIS, R.A., KATZ, A.M. y TRIGGLE, D.J. (1984a):
Comparison of the high affinity binding of calcium channel blocking drugs to vascular smooth muscle and cardiac sarcolemmal membranes. *Biochem.Pharmacol.* 33: 3119-3123.
- SARMIENTO, G.J., JANIS, R.A., RAMPE, D. y TRIGGLE, D.J. (1984b):
 3H BAY K 8644, a calcium channel agonist, binds to high and low affinity sites on membranes from cardiac muscle and brain. *Fed.Proc.* 43: 448.
- SCHATZMANN, H.J. (1961):
Calcium aufnahme und-abgabe am Darmmuskel des Meerschweinchens. *Pflügers Arch.* 274: 295-310.
- SCHATZMAN, H.J. (1964):
Excitation-contraction and calcium in smooth muscle. In: *Pharmacology of smooth muscle*, ed. E. Bülbring. Oxford: Pergamon. pp. 95-104.
- SCHERLING, D., AHR, G. y KARL, W. (1987):
Biotransformation of nisoldipine in man. In: *Nisoldipine 1987*. Ed. P.G. Hugenholtz y J. Meyer. Springer-

Verlag. Berlin. Heidelberg. 1987. pp.: 85-88.

SCHRAMM, M., THOMAS, G., TOWART, R. y FRANCKOWIAK, G. (1983a):

Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics smooth muscle stimulants. *Arzneim.Forsch.* 332: 1268-1272.

SCHRAMM, M., THOMAS, G., TOWART, R. y FRANCKOWIAK, G. (1983b):

Novel dihydropyridines with putative inotropic action through activation of Ca^{++} channels. *Nature (London)* 303: 535-537.

SCHRAMM, M., TOWART, R., LAMP, B. y THOMAS, G. (1985):

Modulation of calcium ion influx by the 1,4, dihydropyridines nifedipine and BAY K 8644. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 7: 493-496.

SCHULTZ, G., HARDMAN, G.J. y HURWITZ, L. (1973):

Importance of calcium for the control of cyclic GMP levels. *Fed.Proc.* 32: 773.

SCHULZ, R. y GOLDSTEIN, A. (1973):

Morphine tolerance and supersensitivity to 5-hydroxytryptamine in the myenteric plexus on the guinea-pig. *Nature* 244: 168-170.

SCHULZ, R., WUSTER, M., SIMANTOV, R., SNYDER, S. y HERZ, A. (1977):

Electrically stimulated release of opiate-like material from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Eur.J.Pharmacol.* 41: 347-348.

SCHWARTZ, L.M., McCLESCKEY, E.W. y ALMERS, W. (1985):

Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. *Nature* 314: 747-751.

SHIBATA, S. y CARRIER, O. (1967):

Antagonizing action of chlorpromazine, dibenamine and phenoxybenzamine on potassium-induced contraction. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 45: 587-596.

SHIBATA, S., CARRIER, O. y FRANKENHEIM, J. (1968):

Effects of chlorpromazine, dibenamine and phenoxybenzamine on the contractile response of taenia coli to potassium, acetylcholine, angiotensin and barium. *J. Pharmacol.Exp.Ther.* 160: 106-111.

- SHIBATA, N., OHASHI, H., TAKEWAKI, T. y OKADA, T. (1978):
Calcium source for contractile response of guinea-pig taenia caecum to carbachol in a calcium deficient, potassium rich solution. Jpn.J.Pharmacol. 28: 561-568.
- SHINO, H. (1976):
Mechanisms of the contracting action of K, acetylcholine and Ba and the antispasmodic action of Cd and Mn on the pyloric antrum strip of rat's smooth stomach particularly in relation to Ca. Folia Pharmacol.Jpn. 72: 95-104.
- SHINOZUKA, K., MAEDA, T. y HAYASHI, E. (1985):
Effects of adenosine on ^{45}Ca uptake and ^3H acetylcholine release in synaptosomal preparation from guinea-pig ileum myenteric plexus. Eur.J.Pharmacol. 113: 417-424.
- SIEKEVITZ, P., CARLIN, R. y WU, K. (1985):
Existence of a voltage-dependent Ca^{2+} channel protein in synaptic membrane (SM) and postsynaptic density (PSD) fractions isolated from cerebral cortex and cerebellum (CC) of canine brain as determined by nitrendipine binding. Soc.Neurosci.Abstr. 11: 646.
- SKOU, J.C. (1957):
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim.Biophys.Acta 23: 394-400.
- SNYDER, S.H. (1984):
Drug and neurotransmitter receptor in brain. Science 224: 22-31.
- SOMOGYI, J. (1964):
Uber die Bindung der Ca-ionen an das Na^+ und K^+ aktivierbare Adenosinphosphatase-system des Gehirns. Experimentia 20: 28-29.
- SPEEDING, M. (1982):
Assesment of " Ca^{++} -antagonistic" effect of drugs in K^+ depolarized smooth muscle. Differentiation of antagonistic subgroups. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 318: 234-240.
- SPEEDING, M. (1985a):
Calcium antagonist subgroups. Trends Pharmacol.Sci. 6,3: 109-114.
- SPEEDING, M. (1985b):
Competitive interactions between BAY K 8644 and nife-

dipine in K^+ depolarized smooth muscle: a passive role for Ca^{++} ? Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 328: 464-466.

SPEDDING, M. y BERG, S. (1984):

Interactions between a "calcium channel agonist" BAY K 8644 and calcium antagonists differentiate calcium antagonist subgroups in K^+ -depolarized smooth muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 328: 69-75.

SPERELAKIS, M. (1962):

Ca^{45} and Sr^{89} movements with contraction of the depolarized smooth muscle. Am.J.Physiol. 203: 860-866.

STREB, H., IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J. y SCHULZ, I. (1983)
Release of Ca^{++} from a non mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5 triphosphate. Nature 306: 67-69.

STRIESSNIG, J., ZERNIG, G. y GLOSSMANN, H. (1985a):

Human red-blood cell Ca^{++} -antagonist binding sites. Evidence for an unusual receptor coupled to the nucleoside transporter. Eur.J.Biochem. 150: 67-77.

STRIESSNIG, J., ZERNIG, G. y GLOSSMANN, H. (1985b):

Ca^{++} antagonist receptor sites on human red-blood cell membranes. Eur.J.Pharmacol. 108: 329-330.

SUEMATSU, E., HIRATA, M., HASHIMOTO, T. y KURIYAMA, H. (1984a):

Inositol 1,4,5 triphosphate releases Ca^{++} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. Biochem.Biophys.Res.Commun. 120: 481-485.

SUEMATSU, E., HIRATA, M. y KURIYAMA, H. (1984b):

Effects of cAMP and cGMP dependent protein kinases and calmodulin on Ca^{2+} uptake by highly purified sarcolemmal vesicles of vascular smooth muscle. Biochim. Biophys.Acta 773: 83-90.

SUGI, H. y DAIMON, T. (1977):

Translocation of intracellularly stored calcium during the contraction-relaxation cycle in guinea-pig taenia coli. Nature London 269: 436-438.

SUGI, H. y TAMEYASU, G. (1975):

Calcium movements in a molluscan smooth muscle. J.Physiol.Soc.Jpn. 37: 215-216.

- SWANSON, T.H. y GREEN, C.L. (1986):
Nifedipine more than a calcium channel blocker. *Gen. Pharmacol.* 17: 255-260.
- SYSON, A.J. y HUDDART, H. (1973):
Contracture tension in rat vas deferens and ileal smooth muscle and its modification by external calcium and the toxicity of the medium. *Comp.Biochem.Physiol.* 45A: 345-362.
- SZURSZEWSKI, J.H. (1973):
Comparison of the excitatory action of acetylcholine and noradrenaline on the guinea-pig myometrium. In *Frontiers in Catecholamine Research*, ed. E. Usdin and S. Snyder. Oxford: Pergamon, pp. 383-388.
- TAKEO, S., ADACHI, K. y SAKANASHI, M. (1985):
A possible action of nifedipine on the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{++} exchange. *Biochem.Pharmacol.* 34: 2303-2308.
- TAMARGO, J. y VALENZUELA, C. (1987):
Fármacos antiarrítmicos. En *Farmacología y su Proyección a la Clínica*. 15ª Edición. Editorial Oteo Madrid (España). pp. 465-480.
- TAYLOR, I.K., CUTHBERT, A.W. y YOUNG, M. (1975):
Muscarinic receptors in rat intestinal muscle: comparison with the guinea-pig. *Eur.J.Pharmacol.* 31: 319-326.
- THOMAS, G., GROB, R. y SCHRAMM, W. (1984):
Calcium channel modulation: Ability to inhibit or promote calcium influx resides in the same dihydropyridine molecule. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 6: 1170-1176.
- TICKU, M.K. y TRIGGLE, D.J. (1976):
Calcium and the muscarinic receptor. *Gen.Pharmac.* 7: 133-140.
- TRIGGLE, C.R., AGRAWAL, D.K., BOLGER, G.T., DANIEL, E.E., KWAN, C.Y., LUCHOWSKI, E.M. y TRIGGLE, D.J. (1982):
Calcium-channel antagonist binding to isolated vascular smooth muscle membranes. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 60: 1738-1741.
- TRIGGLE, C.R. y TRIGGLE, D.J. (1976):
An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea-pig ileal longitudinal muscle. *J.Physiol. London* 254: 39-54.

- TRIGGLE, D.J. (1988);
Canales de Ca^{++} y receptores 1,4-dihidropiridina. J. Cardiovasc.Pharmacol. 9(suppl. 4): S5-S11.
- TRIGGLE, D.J. y JANIS, R.A. (1984):
The 1,4-dihydropyridine receptor: a regulatory component of the calcium channel. J.Cardiovasc.Pharmacol. 6: S949-S955.
- TRIGGLE, D.J. y SWAMY, V.C. (1983):
Circ.Res. 52 (Suppl. I): 17. Tomado de VAN ZWIETEN (1985).
- URAKAWA, N., KARAKI, H. y IKEDA, M. (1970):
Effects of ouabain and metabolic inhibiting factors on Ca distribution during K-induced contracture in guinea-pig taenia coli. Jpn.J.Pharmacol. 20: 360-366.
- VAGHY, P.L., GRUPP, J.L., GRUPP, G., BALWIERCZAK, J.L., WILLIAMS, J.S. y SCHWARTZ, A. (1984a):
Correlation of nitrendipine and BAY K 8644 binding to isolated canine heart sarcolemma with their pharmacological effects on the canine heart. Eur.J.Pharmacol 102: 373-374.
- VAGHY, P.L., GRUPP, J.L. y SCHWARTZ, A. (1984b):
Effects of BAY K 8644 a dihydropyridine analog on [3H] nitrendipine binding to canine cardiac sarcolemma and the relationship to a positive inotropic effect. Circ. Res. 55: 549-553.
- VAN BREEMEN, C. (1969):
Blockade of membrane calcium fluxes by lanthanum in relation to vascular smooth muscle contractility. Arch Int.Physiol.Biochim. 77: 710-716.
- VAN BREEMEN, C., AARONSON, P., LOUTZENHISER, R. y MEISHERI, K.D. (1980):
The biology of calcium ions in the myocardial cell. In: Calcium modulators, ed. by T. Godfraind, A. Albertini and R. Paoletti, pp. 5-16. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- VAN BREEMEN, C. y DANIEL, E.E. (1966):
The influence in high potassium depolarization and acetylcholine on calcium exchange in the rat uterus. J.Gen.Physiol. 49: 1299-1317.
- VAN BREEMEN, C., FARINAS, B.R., CATSEELS, R., GERBA, P., WUYTACK, F. y DETH, R. (1973):
Factors controlling cytoplasmic Ca^{++} concentration. Phil.Trans.R.Soc. London Ser. B. 266: 57-71.

- VAN BREEMEN, C., FARINAS, B.R., GERBA, P. y McNAUGHTON, E.D. (1972):
Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Circ.Res.* 30: 44-54.
- VAN DER KERCKHOFF, W. y DREWES, L.R. (1989):
Transporte de nimodipino y nifedipino a través de la barrera hematoencefálica y su distribución regional "in vivo". *Rev.Clin.Esp.* 185, supl (1): 62-65.
- VAN HARTEM, J., VAN BRUMMELEN, P., WILSON, J.H.P. y BREIMER D.D. (1987):
Pharmacokinetics and haemodynamics effects of nisoldipine in patients with liver cirrhosis. In: *Nisoldipine 1987*. Ed. P.G. Hugenholtz y J. Meyer. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg 1987. pp. 76-79.
- VAN HOUTTE, P.M. (1977):
Cholinergic inhibition of adrenergic transmission. *Fed.Proc.* 36: 2444-2449.
- VAN HOUTTE, P.M. (1987):
The expert committee of the World Health Organization on classification of calcium antagonists: The viewpoint of the rapporteur. *Am.J.Cardiol.* Vol. 59: 3A-8A.
- VAN HOUTTE, P.M. y BHOR, D.F. (1981):
Calcium entry blockers and the cardiovascular system. *Fed.Proc.* 40: 2851-2882.
- VAN HOUTTE, P.M., VERBEUREN, T.J. y LORENZ, R.R. (1975):
Effects of potassium ions on nerve ending and effector cells in adrenergically innervated vascular smooth muscle. *Colloq. INSERM* 50: 425-442.
- VAN ZWIETEN, P.A. (1985):
Calcium antagonists-terminology; classification and comparison. *Arzneim.Forsch.* 35: 298-309.
- VENTER, J.C., FRASER, C.M., SCHABER, J.S., JUNG, C.Y., BOLGER, G. y TRIGGLE, D.J. (1983):
Molecular properties of the slow inward calcium channel. Molecular weight determinations by radiation inactivation and covalent affinity labelling. *J.Biol.Chem.* 258: 9344-9348.
- WANG, T., TSAI, L.I. y SCHWARTZ, A. (1984):
Effects of verapamil, diltiazem, nisoldipine and felodipine on sarcoplasmic reticulum. *Eur.J.Pharmacol.* 100: 253-261.

- WARD, D. y YOUNG, J.M. (1977):
Ligand binding to muscarinic receptors in intact longitudinal muscle strips from guinea-pig intestine. Br.J. Pharmacol. 61: 189-197.
- WAUGH, W.H. (1962):
Role of calcium in contractile excitation of vascular smooth muscle by epinephrine and potassium. Circ.Res. 11: 927-940.
- WAUQUIER, A. (1982):
Brain protective properties of etomidate and flunnarizine. J.Cereb.Blood Flow Metab. (Suppl. I) 2: 553-556.
- WIBO, M., DUONG, A.T. y GODFRAIND, T. (1980):
Subcellular location of semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. Eur.J.Biochem. 112: 87-94.
- WOLLHEIM, C.B., SIEGEL, E.G. y SHARP, G.W. (1984):
Dependency of acetylcholine-induced insulin release on Ca^{++} uptake by rat pancreatic islets. Endocrinology 107: 924-929.
- WORCEL, M. y HAMON, G. (1976):
Changes in ionic fluxes in uterine smooth muscle induced by carbachol. In: Physiology of Smooth Muscle, ed. E. Bülbring and M.F. Shuba. New York: Raven pp. 339-345.
- WUYTACK, F., LANDON, E., FLEISCHER, S. y HARDMAN, T.J. (1978):
The calcium accumulation in a microsomal fraction from porcine coronary artery smooth muscle. A study of the heterogeneity of the fraction. Biochim.Biophys.Acta 540: 253-269.
- YAMAMOTO, H., HWANG, O. y VAN BREEMEN, C. (1984):
BAY K 8644 differentiates between potential and receptor operated Ca^{2+} channels. Eur.J.Pharmacol. 102: 555-557.
- YAMAMURA, H.I., SCHOEMAKER, H., BOLES, R.G. y ROESKE, W.R. (1982):
Diltiazem enhancement of [3H]nitrendipine binding to calcium channel associated drug receptor sites in rat brain synaptosomes. Biochem.Biophys.Res.Comm. 108: 640-646.
- YOUNG, J.M. (1974):
Desensitisation and agonist binding to cholinergic receptors in intestinal smooth muscle. FEBS Lett. 46: 354-356.

VERIFICADA EN EL DEPARTAMENTO DE NOTARÍA
TITULADA Dilucidación por diversos Efectos en
dean de cotayo y S.N.C. de rata.

DE LA QUE ES AUTOR DON Victor A.
del Val Arcondilla

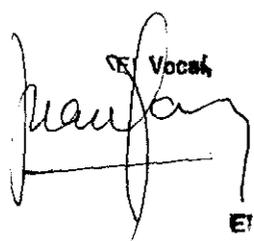
OBTUVO POR ^{UNANIMIDAD} MAYORIA LA CALIFICACION DE EL Apto. "cum laude"

Madrid, 12 de 19

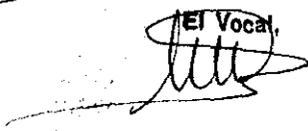
El Presidente,



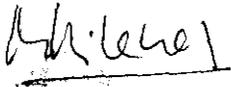
El Vocal,



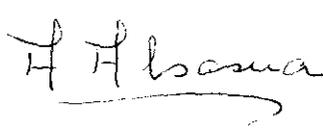
El Vocal,



El Vocal,



El Vocal Secretario,



(1) Aprobado. Notable. Sobresaliente