

R. 19.753

(R)

Te 5 10 11
111

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

**ESTUDIO SOBRE LA IMPORTANCIA DEL
CALCIO EN LA VASOCONSTRICCIÓN
MEDIADA POR ESTIMULO DE
RECEPTORES ALFA-1 Y ALFA-2
VASCULARES**



Alfredo Pintado King

Madrid, 1992

Biblioteca
de Medicina

Colección Tesis Doctorales. N.º 97/92

© Alfredo Pintado King

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-12183-1992

X-53-002321-8



La Tesis doctoral de D. Alfredo Quinto Lozano

titulada estudio sobre la importancia del calcio en la
vasoconstricción por receptores α_1 y α_2

Director Dr. D. Juan A. Fleixandre

fue leída en la Facultad de MEDICINA de la
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

el día 18 de junio de 1991 ante el tribunal constituido
por los siguientes Profesores:

Presidente Pedro Lorenzo Fernández

Vocal José Juanín

Vocal Mercedes Estay

Vocal Dr. Pío Félix Torice

Secretario Juan Toranzo

habiendo recibido la calificación de Apto. Cum
Laude por Unanimitad

Madrid, a 18 de junio de 1991

El Secretario del Tribunal,

Juan Toranzo

- ALFREDO PINTADO KING -

**ESTUDIO SOBRE LA IMPORTANCIA DEL
CALCIO EN LA VASOCONSTRICION
MEDIADA POR ESTIMULO DE RECEPTORES
ALFA-1 Y ALFA-2 VASCULARES**

DIRECTOR: Dra. M^a Amaya Alexandra de Artiñano

Profesor Titular de Farmacología

- UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID -

FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

1991



El Director
del Departamento de Farmacología

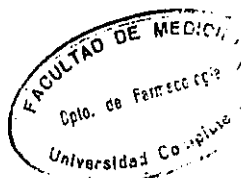
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Tel. 243 78 55

PEDRO LORENZO FERNANDEZ CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ME-
DICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "ESTUDIO SOBRE LA IMPORTANCIA DEL CALCIO EN LA VASOCONSTRICCIÓN MEDIADA POR ESTÍMULO DE RECEPTORES ALFA-1 Y ALFA-2 VASCULARES" ha sido realizada en este Departamento bajo la dirección de la Dra. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano, Profesor Titular de este Departamento, y reúne todos los requisitos necesarios para poder ser defendida y optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Madrid, 23 Abril, 1991.



[Firma manuscrita]



DPTO. DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID
TELEF 449 34 33

M^a AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, PROFESOR TITULAR
DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que el trabajo experimental titulado
"ESTUDIO SOBRE LA IMPORTANCIA DEL CALCIO EN LA VA-
SOCONSTRICCIÓN MEDIADA POR ESTIMULO DE RECEPTORES
ALFA-1 Y ALFA-2 VASCULARES" ha sido realizado por
D. ALFREDO PINTADO KING bajo mi dirección y tute-
la, reuniendo todas las condiciones necesarias
para que con él pueda aspirar a la obtención del
grado de Doctor en Medicina y Cirugía (Farmacolo-
gía).

Para que así conste a los efectos oportu-
nos autorizo la presentación a trámite de dicha
Tesis Doctoral ante la Comisión de Doctorado.

Madrid, 23 Abril, 1991.



Alfonso López Guadaño

DEDICATORIA

**A mi mujer Mercedes y mis hijos Pilar, Alfredo y Jorge,
en compensación del tiempo que les he sustraído para
elaborar esta Tesis.**

MI AGRADECIMIENTO:

A la Dra. M^a Amaya Alexandre de Artiñano como directora de esta Tesis Doctoral, por su amistad, dedicación, consejos y estímulo a lo largo de estos años.

Al Dr. Pedro Lorenzo Fernández, Director del Departamento de Farmacología que ha proporcionado los medios necesarios para la realización de esta Tesis Doctoral.

A los Dres. García Mora, Lisazoain y Puerro que me ayudaron en momentos difíciles.

-----0-----

Este trabajo ha sido subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia, y por Química Farmacéutica Bayer S.A. Quiero también agradecer a la Caja de Ahorros de Madrid la ayuda personal facilitada para la realización de la presente Tesis Doctoral.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
1.- INTRODUCCION.....	3
1.1.- Distribución del calcio en el cuerpo humano.....	4
1.2.- La membrana plasmática como barrera de intercambio de iones.....	7
1.2.1.- Estructura molecular.....	7
1.2.2.- Permeabilidad y transporte de membranas.....	11
1.2.3.- Canales iónicos.....	15
1.2.3.1.- Canal de Na ⁺	15
1.2.3.2.- Canal de K ⁺	19
1.2.3.3.- Canal de Cl ⁻	19
1.2.3.4.- Canal de Ca ⁺⁺	20
1.3.- Agonistas y antagonistas del calcio.....	28
1.4.- Importancia del ión Ca ⁺⁺ para la contracción celular.....	42
1.5.- Receptores vasculares α adrenérgicos.....	56
1.6.- Antecedentes y objetivos de esta Tesis Doctoral.....	82
2.- MATERIAL Y METODOS.....	70
2.1.- Fármacos, metodología general y condiciones de trabajo.....	71
2.2.- Preparación de "pithed-rat".....	75
2.3.- Preparación de anillos de aorta de conejo.....	78
2.4.- Ensayos en "pithed-rat".....	80
2.5.- Ensayos en anillos de aorta de conejo.....	83

2.6.- Tratamiento estadístico de los resultados.....	89
3.- RESULTADOS.....	91
3.1.- Resultados de los ensayos en "pithed-rat".....	92
3.2.- Resultados de los ensayos en anillos de aorta de conejo.....	141
4.- DISCUSION.....	178
4.1.- Discusión de los resultados en "pithed-rat".....	178
4.2.- Discusión de los resultados en anillos de aorta de conejo.....	195
5.- CONCLUSIONES.....	215
6.- BIBLIOGRAFIA.....	219

ABREVIATURAS

Å: angstrom
Ach: acetilcolina
ACV: accidente cerebro vascular
Ad: adrenalina
ADP: adenosín difosfato
Ag α : agonista(s) alfa
AgCa: agonista(s) del calcio
AMP $_c$: adenosin monofosfato cíclico
AnCa: antagonista del calcio
ATP: adenosín trifosfato
Ca $^{++}_{ext}$: ión calcio extracelular
Ca $^{++}_{int}$: ión calcio intracelular
CLM: cadena(s) ligera(s) de miosina
CMD: calmodulina
CTP-PA: citidil transferasa para ácido fosfatídico
D: daltons
DE $_{50}$: dosis efectiva 50
DG: diacilglicerol
DHP: dihidropiridinas
DNA: ácido desoxirribonucleico
EDTA: etilen-diamino-tetraacetato
EGTA: etilen-glicol-(β -aminoetiléter)tetraacetato
ESM: error standard de la media
GABA: ácido γ hidroxibutírico
ia.: intrarterial
IP: inositol 1 fosfato
IP $_2$: inositol 1,4, difosfato
IP $_3$: inositol 1,4,5 trifosfato
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
iv.: Intravenosa

kD: kilodaltos

L_v : canal L de calcio situado en neurona

L_m : canal L de calcio situado en músculo

mM: milimolar

mV: milivoltio

mS: milisiemens

μ M: micromolar

μ W: microwatio

NA: noradrenalina

nm: nanometro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: ácido fosfatídico

PI: fosfatidilinositol

PIP: fosfatidilinositol 4-fosfato

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-difosfato

pMol: picomolar

ps: picosiemens

PSD: presión sanguínea diastólica

ROC: Canal(es) operados(s) por receptor o receptor dependiente(s)

TCX: Tetrodotoxina

TEA: tetraetilamonio

TTX: tetrodotoxina

VOC: Canal(es) operado(s) por voltaje o voltaje dependiente(s)

w-CgTx: w-conotoxina o toxina w-VIA conus geographus.

1.- INTRODUCCION

1.1.- DISTRIBUCION DEL CALCIO EN EL CUERPO HUMANO.

El calcio es un elemento abundante en la naturaleza. Aparece formando parte aproximadamente del 3.4% de la litosfera. Es un metal alcalinotérreo, situado en la tabla periódica en el grupo IIA, cuyo n° atómico es 20, y cuya configuración electrónica es: $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p^4, 4s^2$. Sus características químicas, junto con las de otros elementos también presentes en el cuerpo humano figuran en la Tabla I.

TABLA I

CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LOS DISTINTOS
IONES ABUNDANTES EN EL CUERPO HUMANO.

	Ca ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Mg ⁺⁺
Radio del ión en Å	1.97	1.90	2.35	0.99	1.60
Radio metálico o covalente en Å	0.99	0.95	1.33	1.70	0.65
I ₁ (electrón voltios)	6.11	5.14	4.34	12.96	7.64
I ₂ (electrón voltios)	11.87	47.29	31.81	---	15.03
Energía de red (voltios)	-2.67	-2.71	-2.92	-1.39	-2.34
Punto de fusión (°C)	851	96	63.5	-103	651
Punto de ebullición (°C)	1437	883	759	-35	1107

I₁ = Potencial para la primera ionización

I₂ = Potencial para la segunda ionización

(Tomada de Cotton y Wilkinson 1986)

El potencial de ionización como se observa en la Tabla I no es muy alto para la 2ª ionización, por lo que generalmente se presenta en forma de catión divalente Ca^{++} . Este presenta una configuración externa de 8 electrones tipo $3s^2, 3p^6$, que tiene una densidad de carga simétricamente esférica, y es muy estable. El potencial de ionización depende en realidad de la carga, radio y configuración electrónica, y es inverso a la propia estabilidad del catión. El catión divalente Ca^{++} es capaz de formar fácilmente complejos con proteínas que tengan alto contenido en glutámico y aspártico, siendo este factor determinante de reacciones biológicas.

Se puede comprobar por las medidas de los radios de los iones realizadas mediante técnicas de difracción de rayos X, que los iones Na^+ y Ca^{++} tienen un radio muy semejante, por lo que dada la concentración de ambos en el cuerpo humano no es extraño que sean los principales iones que se intercambiarán a través de la membrana plasmática. Otros iones como el Cl^- y el K^+ difunden con más dificultad por su tamaño, o bien como en el caso del Mg^{++} difunden poco por la escasa cantidad existente en el organismo.

En el cuerpo humano el calcio se encuentra fundamentalmente formando parte de los huesos. El hueso compacto está formado por alrededor de un 25% en peso de matriz orgánica y un 75% en peso de sales. Estas sales cristalinas que se depositan entre la matriz orgánica del hueso, son principalmente sales de calcio y fosfato, siendo la hidroxiapatita la sal más importante. Estos cristales cálcicos presentan forma de placa delgada y alargada, de 200 a 400 Å de longitud y de 10 a 30 Å de ancho, existiendo entre ellos iones Mg^{++} , Na^+ , K^+ , CO_3H^- que no forman redes cristalinas sino que se encuentran situados en la superficie de los cristales de hidroxiapatita.

De la fracción total del calcio óseo, hay una pequeña parte del calcio que oscila entre el 0'4 y 1% (dependiendo de la edad del sujeto y del tipo de hueso), que se encuentra en forma fácilmente intercambiable con el calcio plasmático. Esto es debido a que forma sales de más fácil movilización que la hidroxiapatita.

En el plasma hay unas cifras de calcio de 9.5 ± 0.5 mg%, lo que supone una concentración aproximada de 2.4 mM/l. El calcio plasmático se encuentra de tres formas diferentes :

1.- El 40% aproximadamente (lo que supone una concentración de 1.0 mM/l.) está combinado a las proteínas plasmáticas no pudiendo por tanto difundir por la

membrana capilar.

2.- El 50% (1.2 mM/l.) aparece en forma de calcio iónico (Ca^{++}), siendo esta forma ionizada la que difunde a través de la membrana capilar.

3.- El 10% restante (0.2 mM/l.) no aparece como calcio ionizado, sino combinado con otros componentes del plasma en forma de citratos y compuestos semejantes.

Los datos sobre la distribución del calcio en el cuerpo humano se han tomado de Valotton 1985 y Guyton 1988 .

1.2.- LA MEMBRANA PLASMÁTICA COMO BARRERA DE INTERCAMBIO DE IONES.

1.2.1.- ESTRUCTURA MOLECULAR

La membrana plasmática forma el límite entre el interior de la célula y el medio ambiente que la rodea. Está encargada de conservar el ambiente interior merced a sus propiedades de permeabilidad y a su capacidad de transportar iones y nutrientes.

La propuesta inicial de su estructura fue formulada por Danielli y Davson (1935), quienes mantuvieron la teoría de la "membrana unitaria", describiendo la membrana con un aspecto trilaminar de doble capa proteica (una exterior y otra interior), y una capa intermedia bimolecular de lípidos. Esta configuración fue descrita por estos autores al observar que aparecían tres bandas como artefacto de las tinciones. Este aspecto era similar en todas las membranas plasmáticas, aunque la composición en proteínas y lípidos difería considerablemente de unas a otras.

Posteriormente como resultado del perfeccionamiento de los métodos de investigación, se establecieron diversas modificaciones sobre esa estructura. Hoy en día la estructura de la membrana plasmática se encuentra muy definida merced a la aplicación de las técnicas de difracción de rayos X, y de congelamiento-fractura, réplica y microquímica.

El modelo más aceptado hoy es el formulado por Singer y Nicolson (1972). Estos autores proponen una membrana de configuración asimétrica, y de espesor entre 70 y 100 Å, que no es permeable a las macromoléculas (Figura 1).

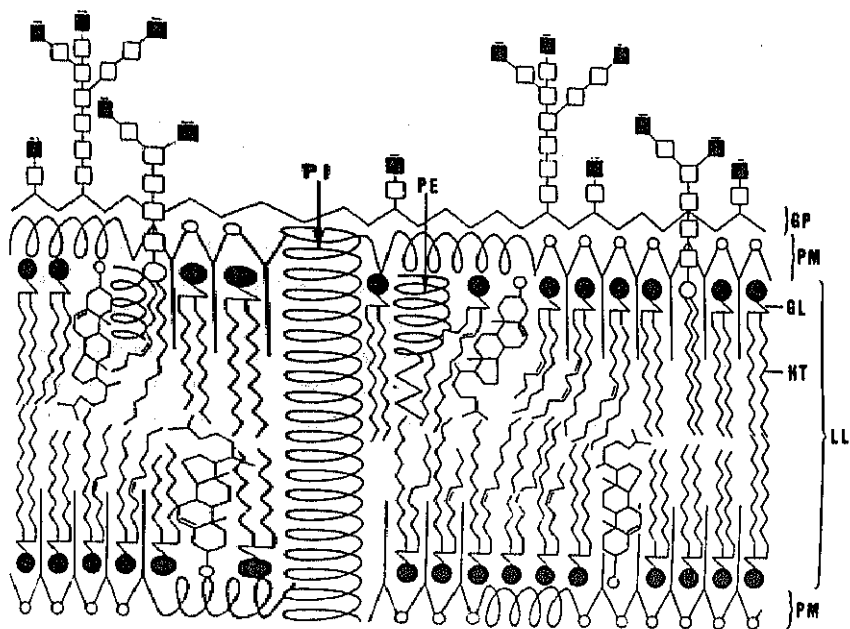


FIGURA 1.- Representación esquemática según Singer y Nicolson de la estructura de la membrana. GP, glicoproteína con residuos terminales de ácido siálico (■) hacia el exterior. PM, monocapas de proteína estructural en la superficie externa e interna. LL, capa lipídica bimolecular en la que se distinguen los grupos polares de glicerol (GL) hacia el exterior y los grupos apolares de los fosfolípidos (HT) hacia el interior. PI, proteínas intrínsecas que atraviesan completamente la membrana y forman los canales. PE, proteínas extrínsecas que no atraviesan la membrana y forman los receptores. (Modificación del esquema de Bowman y Rand 1984)

Nos encontramos por tanto con una bicapa lipídica compuesta principalmente por fosfolípidos, glicolípidos y colesterol, orientados de tal manera que los grupos polares o hidrófilos de las moléculas (glicerol) se encuentran situados hacia el exterior, mientras que las cadenas apolares o hidrófobas de ácidos grasos se encuentran situados hacia el interior. Esta es una disposición general, pero en las distintas membranas los fosfolípidos contienen ácidos grasos que pueden ser saturados o insaturados. Si la proporción de ácidos grasos insaturados es elevada se provoca una deformación estructural que trae como consecuencia una disposición menos ordenada de las colas de los ácidos grasos. Esto hace que la estructura sea menos rígida, dando a la membrana un carácter más fluido y aumentando por tanto su permeabilidad.

Por otra parte, otro de los componentes grasos de la membrana es el colesterol. El colesterol se encuentra en mayor abundancia en la parte interna de la membrana y contribuye a dar mayor rigidez a la estructura inmovilizando las colas de los ácidos grasos. Por tanto disminuye la permeabilidad, y contrarresta el efecto descrito por la abundancia de ácidos grasos insaturados.

La capa proteica es también doble (una exterior y otra interior). Muchas de las proteínas integrantes tienen naturaleza anfipática por estar compuestas de aminoácidos polares y no polares, tendiendo las partes polares a disponerse hacia la superficie externa de la membrana (zona de las regiones polares), y las partes no polares hacia la zona no polar interna lipídica, compuesta como se ha descrito por los ácidos grasos y el colesterol.

Además de las proteínas de la doble capa, existen otras que atraviesan completamente la membrana de parte a parte, y que se denominan proteínas intrínsecas, y otras que penetran en la membrana pero sin atravesarla y son las llamadas proteínas extrínsecas. La misión de las proteínas intrínsecas es la de formar los poros o canales, mientras que las proteínas extrínsecas forman parte de los receptores.

Más externamente a todo lo descrito, se encuentra una capa que es una prolongación de glicolípidos o de glicoproteínas, y que presenta como característica más relevante la abundancia de ácido silícico, por lo que se encuentra cargada negativamente y permite la fijación de los múltiples cationes extracelulares, principalmente Ca^{++} , Na^+ , K^+ . A estas porciones de carbohidratos les corresponden

parte de las propiedades antigénicas de las superficies celulares.

De este modo las proteínas que se encuentran en el citoplasma, al no poder salir al exterior, atraerían hacia el interior moléculas de agua, y la célula estallaría si no fuese porque existen en el exterior sustancias que equilibran este juego de presiones. Entre las sustancias presentes en el exterior celular están los iones que se encuentran en distintas concentraciones dentro y fuera de la célula, como se puede apreciar en la Tabla II.

TABLA II

**CONCENTRACION DE ALGUNOS IONES IMPORTANTES
EN EL INTERIOR Y EXTERIOR CELULAR.**

Ión	Concentración extracelular(mM)	Concentración intracelular(mM)
Ca ⁺⁺	2 - 5	10 ⁻⁴ - 10 ⁻³
Na ⁺	130 - 150	5 - 20
K ⁺	3 - 6	120 - 140
Cl ⁻	100 - 140	2 - 10
Mg ⁺⁺	1 - 2	10 - 30

(Tomada de Rüegg 1988, con modificaciones)

La diferente concentración de iones entre el exterior celular y el citoplasma, trae consigo una diferencia de potencial entre la parte externa y la interna de la membrana, que en algunos casos puede llegar a ser de hasta -85 mV. La parte externa se encuentra cargada positivamente por el exceso de cationes existentes respecto a la parte interna. Para conservar esta diferencia de potencial eléctrico, la membrana presenta unas propiedades dieléctricas, que unidas a la facilidad de paso que tienen las sustancias grasas frente a otro tipo de moléculas, sugieren que la mayoría de la membrana esta formada por sustancias lipídicas.

1.2.2.- PERMEABILIDAD Y TRANSPORTE DE MEMBRANAS

La descripción matemática de la conducción del impulso eléctrico en la membrana plasmática está basada en corrientes iónicas de circuito locales. Se denominó "teoría del cable", y fue postulada por Hodgkin y Rushton (1946) para describir las consecuencias del flujo iónico en la propagación eléctrica unidimensional, que es la más sencilla .

Una vez postulada la ecuación general, la estrategia experimental para aislar los componentes de las corrientes iónicas individuales se ha basado en emplear técnicas cinéticas y farmacológicas. Los iones se desplazan a través de las membranas pasando por canales que discriminan entre distintos portadores de carga, y así la permeabilidad de un canal a varios iones se denomina " selectividad " del canal y queda reflejada por la siguiente ecuación :

$$I_i = G_i(E, m, t) \cdot (E_m - E_i)$$

I_i = corriente iónica

$G_i(E, m, t)$ = conductancia dependiente del voltaje y tiempo

E_m = potencial de membrana bajo control experimental

E_i = potencial de equilibrio de un canal particular

Esta ecuación es una simplificación de la formulada por Hodgkin y Rushton , y podemos observar en ella que existen una serie de factores que posibilitan o impiden el paso de determinadas moléculas o iones a través de la membrana, y que con caracter más general se resumen en: volumen, carga, liposolubilidad y gradiente de concentración.

Las moléculas de gran tamaño atraviesan la membrana por procesos de pinocitosis o exocitosis, mientras que las moléculas de pequeño tamaño, dependiendo de la ecuación vista, así como de los factores descritos, atraviesan la membrana por tres mecanismos fundamentales que han sido descritos por múltiples autores :

- * Difusión pasiva
- * Difusión facilitada
- * Transporte activo

Mediante un mecanismo de difusión pasiva penetran con facilidad al interior de la célula las moléculas de pequeño tamaño que no son polares. Si la molécula es pequeña y polar pero sin carga, puede penetrar también por este mecanismo (ej. agua, urea, glicerol...). Las moléculas ionizadas no pueden penetrar por este mecanismo.

La difusión facilitada se efectúa por medio de proteínas específicas de la membrana que pueden actuar como canales específicos, o como sistemas transportadores. Por este mecanismo se introducen las moléculas o iones a favor de un gradiente electroquímico, por lo que la característica fundamental para que exista difusión facilitada es que no exista gasto de energía. Los cuatro iones más importantes que regulan la actividad celular (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++}) tienen diferentes canales que utilizan este tipo de mecanismo para pasar a través de la membrana. Estos canales se describirán con detalle más adelante, y tienen fundamentalmente dos mecanismos de apertura. Así pueden abrirse mediante una despolarización previa en la membrana, y son los canales operados por voltaje o voltaje dependientes (VOC), o bien puede abrirse mediante la interacción de un ligando a un receptor asociado al canal y son los canales operados por receptor o receptor dependientes (ROC). Los fármacos pueden actuar en el receptor ocupándolo y presentando una acción agonista o antagonista, o bien pueden bloquear el canal propiamente dicho mediante una interacción con una molécula del canal.

Cuando se realiza un transporte a través de la membrana en contra de un gradiente, utilizando proteínas a modo de transportadores y acoplando una fuente de energía para su consumo (en general es la hidrólisis de ATP o adenosin trifosfato a ADP o adenosin difosfato), tenemos un transporte activo.

A ambos lados de la membrana ya sabemos que existen diferentes concentraciones de iones, como quedó reflejado en la Tabla II. Como consecuencia de la apertura de los canales descritos entran una parte de estos iones, debiendo ser posteriormente transportados al exterior para que se restablezca la normalidad en la distribución iónica en contra de un gradiente de concentraciones, y a veces de cargas. Este proceso se realiza usualmente mediante el intercambio de un ión con otro por medio de un sistema enzimático conocido con el nombre de ATPasas o bombas de iones, que funciona como un sistema de transporte activo.

Se han descrito los siguientes sistemas de intercambio de iones (Florez y col 1986, Rüegg 1988):

a) Na^+/K^+ -ATPasa .- Esta bomba tiene una importancia fundamental en el potencial de acción en las células nerviosas, y es de vital importancia en el movimiento iónico en las células del túbulo renal, del hematíe, del músculo cardíaco, etc. Su número por cada célula es de varios cientos de miles. Por cada molécula de ATP hidrolizado bombea tres moléculas de Na^+ hacia el exterior y dos moléculas de K^+ hacia el interior, por lo que es una bomba electrogénica. El enzima responsable de este transporte activo es por lo tanto la ATP-asa Na^+/K^+ que está formada por dos subunidades : α y β . La α tiene unos 120 kD de peso molecular, mientras que la β es una glicoproteína de 50 kD. Un potente inhibidor de esta ATP-asa es la ouabaina, uno de los múltiples glucósidos de la digital.

b) Ca^{++} -ATPasas .- Utilizan también el ATP como fuente de energía. Los enzimas responsables son proteínas ATP-asas $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ dependientes de las que se han aislado al menos dos. La mayor de 140 kD es sensible a la calmodulina (CMD), que es una proteína abundante en el citoplasma con cuatro sitios de unión para los iones Ca^{++} . Dos de los sitios están ocupados permanentemente, y la unión a un tercero y posiblemente a un cuarto ión calcio es lo que modifica la estructura de la CMD, convirtiéndola en un activador de la bomba de calcio. La función y estructura de la CMD se describirá con más detalle en el apartado 1.4. La extraordinaria alta afinidad de la Ca^{++} -ATPasa por el calcio hace que extraiga los iones calcio de la célula a pesar de la gran diferencia de concentraciones que existe entre el interior y el exterior (la concentración es del orden de 10^3 a 10^4 veces superior en el exterior). Probablemente, el transporte de iones Ca^{++} está acoplado a la toma de dos H^+ , por lo que es neutro desde el punto de vista eléctrico. El número de moléculas Ca^{++} -ATPasa por célula es más reducido que el de Na^+/K^+ -ATPasa (algunos miles por célula frente a los varios cientos de miles). Esta bomba está presente en todos los tipos de célula, por lo que se supone desde el punto de vista evolutivo que es muy antigua. Existe otra Ca^{++} -ATPasa en el retículo endoplásmico que es más pequeña y tiene un peso molecular de 94 kD. No es sensible a la CMD, sino que es activada por medio de una fosforilación dependiente del adenosín monofosfato

cíclico (AMPc). Esta bomba disminuye la concentración de calcio en el citoplasma, rellorando los depósitos internos de calcio que posteriormente servirán para la liberación del calcio intracelular.

c) Intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.- En algunas membranas celulares, como puede ser el sarcolema de las células miocárdicas, la bomba de intercambio Na^+/K^+ genera un gradiente iónico que se asocia a un transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que es bidireccional y que intercambia tres moléculas de Na^+ por una de Ca^{++} , siendo por tanto el resultado electrogénico. Así pues, la salida de tres Na^+ y entrada de dos K^+ se acopla con la entrada de los tres Na^+ y salida de un Ca^{++} . No se conoce ningún fármaco que altere directamente este transportador, aunque la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ puede influir directamente sobre él.

1.2.3.- CANALES IONICOS

Hemos visto que como resultado de las diferentes concentraciones de iones, estos pueden atravesar las membranas de una forma pasiva mediante una difusión facilitada.

De entre los sistemas que posibilitan este flujo de iones, los más importantes son en realidad los canales de iones. Son específicos en mayor o menor grado para determinados iones, y están regulados como se ha señalado por cambios de potencial de membrana (VOC) o por receptores (ROC) que permiten su apertura o cierre.

Aunque el punto principal a considerar para esta Tesis es la dinámica del ión Ca^{++} por los canales del músculo liso vascular, merece la pena describir al menos someramente el resto de los principales canales para otros iones. Son importantes además las implicaciones tan cercanas que tienen los mecanismos de apertura y cierre de los distintos tipos de canales, y en el caso de los canales del Na^+ la investigación ha podido profundizar mucho sobre su estructura y mecanismos de funcionamiento, permitiendo por analogía ir descubriendo o al menos intuyendo los del resto.

1.2.3.1.- CANAL DE Na^+

Se han descrito canales de Na^+ que son operados por receptor (Na^+ ROC), y canales de Na^+ que son voltaje dependientes (Na^+ VOC).

Según Ruff (1986) el canal Na^+ ROC esta asociado con el receptor colinérgico de naturaleza nicotínica, y ha sido perfectamente estudiado en ciertos invertebrados marinos como es el "*Torpedo marmorata*", debido a la riqueza de receptores nicotínicos que posee. Se trata de una proteína pentamérica de cinco subunidades: 2α , 1β , 1γ y 1δ . Tiene 140 Å de largo, por 80 Å de ancho; sobresaliendo unos 70 Å hacia la parte externa de la membrana y 30 Å hacia la parte interna citoplasmática; habiéndose calculado que tiene un diámetro aproximado entre 3 y 5 Å por el tamaño de las moléculas que lo atraviesan.

Las subunidades aisladas tienen pesos moleculares de 40 kD la α , 50 kD la β , 60 kD la γ y 65 kD la δ . Mediante técnicas de clonaje de DNA se ha podido saber

la secuencia exacta de sus subunidades proteicas y las de sus genes codificadores. Los pesos moleculares de las subunidades calculados al conocer la secuencia exacta de los aminoácidos difieren algo de los señalados anteriormente, y así nos encontramos con que serían de 53649 D para la α , 56060 D para la β , 58063 D para la γ y 59792 D para la δ . Las diferencias entre lo que predice la secuencia de aminoácidos y lo que resulta de aislar las subunidades de los tejidos se debe a la proteólisis que sufren en los procesos de manipulación. Por otra parte, está demostrado que la secuencia de las subunidades en cerebro y músculo es muy parecida, pero no exacta. No son péptidos idénticos, lo que nos sugiere la codificación por genes distintos (Conti-Tronconi y col. 1985). Los estudios en músculo de mamíferos (Takay y col 1985) demuestran que la subunidad γ es sustituida por otra subunidad llamada ξ en las zonas de sinapsis, permaneciendo en el resto de las localizaciones tisulares la subunidad γ . Esta nueva subunidad ξ tiene un peso molecular de 52568 D.

En la Figura 2 se observan varios esquemas de distintos autores de las cinco subunidades. Existen también varios esquemas de como se sitúa la cadena peptídica a través de la membrana plásmatica, que se representan en la Figura 3. Se puede comprobar en todos que la porción N-terminal se encuentra en la parte externa de la membrana. Los fármacos pueden inhibir el canal ocupando este receptor N-glicosado externo, o bien una vez abierto el canal entrando en el mismo, y ocupando los múltiples receptores que allí existen (bloqueo del canal). Por último hay fármacos que utilizan los dos mecanismos para inhibirlo.

Para Ruff (1986) el canal Na⁺ VOC es una glicoproteína de peso molecular aproximadamente 260 kD, correspondiendo el 29% del peso a carbohidratos. Está formado por tres subunidades llamadas α_1 , β_1 , β_2 , para distinguirlas de las que forman el canal Na⁺ ROC. Este canal se inhibe muy selectivamente con tetrodotoxina (TTX), que es un veneno que se extrae de varios animales, pero fundamentalmente del pez "*Spherooides porphyreus*" de la familia "*Tetraodontidae*" de donde toma su nombre el compuesto. El canal se activa y abre permitiendo la entrada de Na⁺ con la batracoloxina y veratridina (Horn y col. 1981). También se puede conseguir su apertura tras sucesivas despolarizaciones en la membrana.

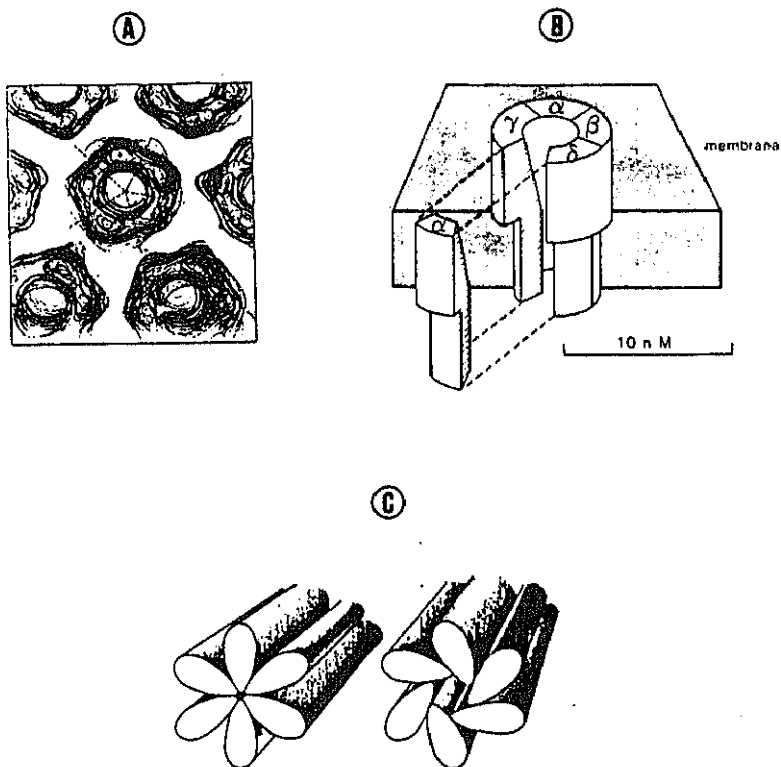


FIGURA 2.- A) Disposición pentagonal y simétrica de las subunidades situadas perpendicularmente al plano de la membrana, en visión tomada desde la hendidura sináptica a partir de una imagen electrónica tridimensional de cristales de moléculas receptoras obtenidas de *Torpedo marmorata*, (Tomada de Brisson y Unwin, 1985).

B) Esquema de las cinco subunidades que forman el canal del receptor colinérgico nicotínico. (Tomado de Florez y col., 1987).

C) Diagrama representando la forma en que rotan las subunidades en los canales iónicos para su apertura y cierre. (Tomado de Ruff, 1986).

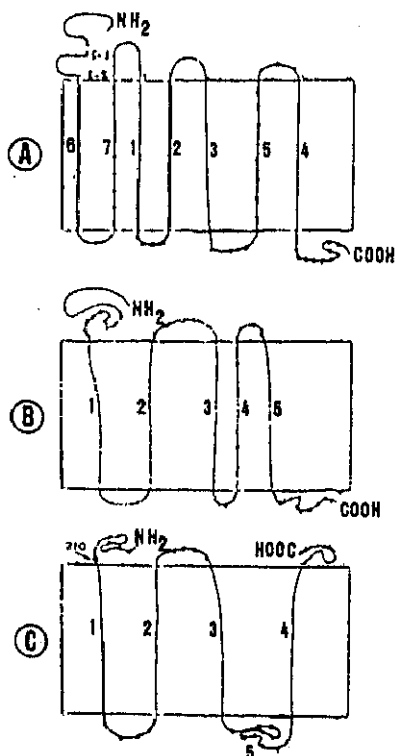


FIGURA 3.- Diagrama representando tres diferentes esquemas de organización de la estructura secundaria de la proteína de la subunidad α .

A) Hay 7 cadenas, de las que 1 a 4 atraviesan el poro, y las 3 anfipáticas (cadenas 5-6-7) al atravesar el poro forman los múltiples receptores que tiene el mismo.

B) Hay 5 cadenas que atraviesan el poro, siendo la cadena 5 anfipática. Tanto en este esquema como en el anterior se ha comprobado por medio de anticuerpos monoclonales que el extremo con el C-terminal se encuentra en la parte interna de la membrana, y el extremo con el N-terminal en la parte externa.

C) En este los 210 aminoácidos iniciales están en el exterior, junto al extremo N-terminal y la cadena 4 que es la C-terminal también es externa. Las cadenas 1-2-3 se extienden a través del poro, y la cadena 5 que es anfipática se sitúa en el citoplasma.

(Tomada de Ruff, 1966).

1.2.3.2.- CANAL DE K⁺

La estructura del canal de K⁺ se conoce menos, y para Ruff (1986) este canal se puede regular por una serie de mecanismos entre los que figuran cambios de potencial de membrana (activándose el canal por despolarizaciones entre -50 mV y -40 mV), o acciones directas sobre el receptor propio del canal, o acciones de mensajeros intracelulares. También podría activarse por cambios en la concentración de otros iones y hay canales de K⁺ que son Ca⁺⁺-dependientes, y otros que son Na⁺- dependientes.

La secuencia de selectividad en músculo de rana para este tipo de canal es: K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺ > Na⁺ > Li⁺; y basándose en el tamaño de los iones que lo atraviesan se ha postulado que el canal tiene un diámetro entre 2.6 y 3.3 Å, y una longitud de 70 Å (Ruff 1986). El transporte iónico de este canal se inhibe específicamente por tetraetilamonio (TEA), y también por Zn⁺⁺ y 4 aminopiridinas. En el caso del ión K⁺ como su concentración intracelular es mayor que la extracelular (como se especificó en la Tabla II), existen canales pasivos de K⁺ que extraen a favor de un gradiente los iones hacia el exterior. Esto sucede en células en reposo, y contribuye a mantener el potencial de membrana y la polarización de la célula.

La apertura del canal de K⁺ voltaje dependiente (K⁺ VOC) se efectúa con cierto retraso respecto a la apertura de los canales Na⁺ VOC, contribuyendo la salida masiva de iones K⁺ a la repolarización celular. Así la conductancia del K⁺ en músculo esquelético de mamíferos oscila entre 6 y 23 mS/cm², siendo desde luego más lenta que la del Na⁺ que oscila entre 10 y 35 pS/cm² (Almers y col 1984). Los canales de K⁺ no se inactivan de inmediato, permaneciendo abiertos todo el tiempo que la membrana está despolarizada. Este retraso del cierre de los canales de K⁺ es además el responsable de que exista un corto período de tiempo de hiperpolarización en la membrana. Existe otro canal del K⁺, llamado canal de K⁺ precoz que se activa y se inactiva tan rápido como el del Na⁺.

1.2.3.3.- CANAL DE Cl⁻

La entrada de Cl⁻ al interior de la célula se realiza a favor de un gradiente de concentración. En la Tabla II se señaló ya que su concentración era mayor en el

espacio extracelular y produce en el interior celular un aumento mayor de cargas negativas. La entrada se efectúa por tanto en contra del gradiente eléctrico y ocasiona hiperpolarización. La conductancia de este canal oscila entre 0.2 mS/cm² a 2 mS/cm² según la especie animal, produciéndose la apertura del canal con potenciales de membrana entre -80 mV y -120 mV.

La secuencia de permeabilidad para este tipo de canal es $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$, y el canal se bloquea por ácidos carboxílicos aromáticos, de manera que si se trata la membrana con 5 μM de ácido antracénico se produce un cambio en la secuencia de permeabilidad iónica, resultando ahora inversa de la anterior. Esto demuestra que el tratamiento al que se ha sometido altera la estructura del canal (Ruff 1986).

Muchos de los procesos de inhibición que hay en las células, se deben a la entrada de Cl^- al interior del citoplasma. El canal del Cl^- tiene varias subunidades proteicas, cada una de las cuales tiene receptores para determinados ligandos, siendo el más conocido el receptor del ácido γ -hidroxibutírico (GABA). El GABA al interactuar con el receptor del canal provoca cambios alostéricos de la estructura, abriendo el canal y penetrando iones Cl^- .

1.2.3.4. CANAL DE Ca^{++}

La consideración de los canales del Ca^{++} será fundamental en esta Tesis Doctoral, siendo posiblemente los canales que más se están estudiando en la actualidad.

En la Figura 4 se representa un esquema de un canal del Ca^{++} , y la Figura 5 muestra los distintos estados en que se puede encontrar el canal.

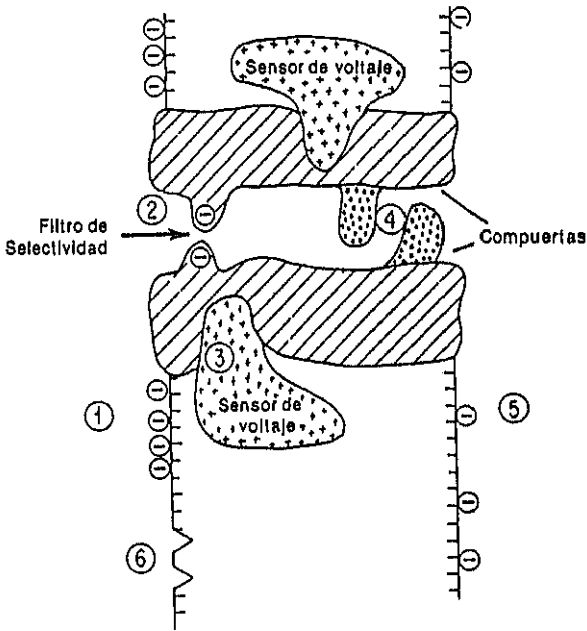


FIGURA 4.- Representación esquemática de un canal de calcio. El canal se representa como un poro que contiene en su interior una zona cargada negativamente (2), que actúa como "filtro selectivo" y distingue los diferentes cationes. El sensor de voltaje (3) permite la apertura y cierre del canal dependiendo del voltaje. Las compuertas del canal (4), determinan el carácter abierto o cerrado del canal. Las zonas cargadas negativamente sobre la superficie de la membrana externa (1) e interna (5), captan particularmente cationes divalentes, modulando el potencial transmembrana detectado por los sensores de voltaje. Una zona de receptor (6) está adyacente al canal. (Tomada de Fialm y Zeiss, 1982).

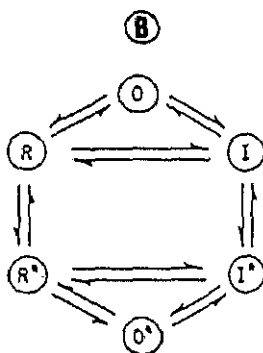
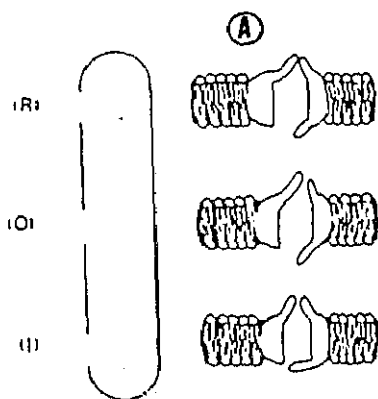


FIGURA 5.- Representación de un esquema cíclico mostrando las transiciones del canal de Ca^{++} entre el estado de reposo (R), el estado abierto (O) y el estado inactivado (I). Los estados normales figuran sin asterisco, mientras que los estados en que existe unión a un fármaco tienen asterisco. Las constantes de ritmo que gobiernan estas transiciones pueden ser dependientes del voltaje. (Tomadas de: (A) Schwartz, 1987; (B) Triggie y Janis, 1984).

Hemos visto que el estímulo que hace penetrar el Ca^{++} al interior de la célula puede ser de dos tipos: una onda despolarizante que se propaga a lo largo de la membrana y que activaría el canal Ca^{++} VOC, o bien la activación de un receptor por un ligando (aún en el caso de tejidos despolarizados) que activaría el canal Ca^{++} ROC. Así pues tenemos el canal Ca^{++} VOC y el canal Ca^{++} ROC que reciben más usualmente la denominación de canales VOC y ROC respectivamente, usándose esta simplificación en la presente Tesis .

Para estudiar los procesos de activación de los canales iónicos se han ideado una serie de técnicas que nos permiten medir el paso de corrientes iónicas, es decir de cargas, a través de la membrana. En definitiva lo que medimos es el paso de corriente eléctrica. La técnica más usada en el momento actual es la del "patch clamp" o parche de membrana que consiste en la colocación de una micropipeta en la superficie de la membrana, introduciéndola dentro de la misma al romperla. De este modo, se puede estudiar en el trozo que queda en su interior los canales iónicos. Si lo que hay son canales de K^+ estos se bloquearan con Cs, mientras que si son canales de Na^+ se bloquearan con TTX, y por último si se quiere comprobar que se mide corriente de Ca^{++} , esta se puede bloquear con La^{+++} o con antagonistas del calcio.

El canal ROC se ha definido peor que el canal VOC. Pueden existir en la membrana receptores en los que interaccionan distintos transmisores, provocando esta interacción la apertura de canales de Na^+ ó de K^+ , con lo que a su vez se ocasiona una despolarización local que permite la apertura del canal VOC próximo al receptor. Existirían otros receptores en los que el estímulo de sus ligandos pone en marcha las alteraciones bioquímicas correspondientes a la vía de los fosfolinosítidos dando como producto final inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 , como se describirá más adelante, provoca aumento de Ca^{++} en el citoplasma a expensas de depósitos intracelulares, y es también capaz de abrir los canales ROC para la entrada de Ca^{++} extracelular ($\text{Ca}^{++}_{\text{ext}}$) (Triggle 1987).

El canal VOC se ha estudiado más intensamente que el ROC conociéndose por tanto mejor su estructura. Se trata de una glucoproteína con unos receptores que han sido perfectamente caracterizados por técnicas de radioligandos. Así en estos canales distintos autores han caracterizado el receptor para 1-4 dihidropiridinas (1-4 DHP) usando nitrendipina tritlada y nimodipina tritlada (Glossman y col. 1982,

Bolger y col. 1983, Glossman y Ferry 1985). También se ha caracterizado el receptor para fenilalquilaminas usando verapamil tritiado y desmetoxiverapamil tritiado (Ferry y col. 1984); y el receptor para benzotiazepinas usando d-cis-diltiazem tritiado (Schoemaker y Lager 1985). De todos ellos el receptor mejor estudiado es el de 1-4 DHP y en este caso el canal está formado por una glucoproteína de un peso molecular de aproximadamente 210 kD, con tres subunidades de pesos moleculares 130 - 142 kD, 50 kD y 33 kD respectivamente (Reuter y col 1985). En realidad el peso molecular de la proteína puede variar según las distintas preparaciones siendo en ileon de cobaya 278 kD (Venter y col. 1983), en cerebro de cobaya 185 kD (Ferry y col. 1983 a) y en músculo esquelético de cobaya 115-178 kD (Ferry y col 1983 b, c).

A partir de las membranas purificadas también se ha determinado la densidad de receptores para 1-4 DHP (Triggly y Janis 1987), existiendo variación entre distintas preparaciones : en túbulo T de músculo esquelético es superior a 65 pmol/mg; en sarcolema cardíaco varía entre 1-2 pmol/mg; en músculo liso no vascular es 0.8 pmol/mg; en membrana sináptica es 0.6 pmol/mg; y en músculo liso vascular es 0.2 pmol/mg.

La secuencia de permeabilidad del canal del calcio para los distintos iones varía también según la especie, de forma que en preparaciones de cobaya es $Cd > Ca & Sr > Ba > Mg$ (Lansmann y col. 1986), mientras que en músculo esquelético de rana es $Ba > Sr > Ca > Mn > Mg$ (Ruff 1986). Este mismo autor basándose en el tamaño de los iones que atraviesan el canal de calcio (el ión mayor que atraviesa es el catión tetrametilamonio), postula que el diámetro aproximado del mismo es de 6 Å. La vida media "in vivo" de cada canal de Ca^{++} es de aproximadamente 40 horas (Triggly y col 1986).

Los iones Ni^{++} , Co^{++} y La^{+++} , actúan bloqueando el canal del calcio. De todos ellos el más potente y de acción más duradera es el La^{+++} (Stanfield P.R. 1986, Ruff 1986). El mecanismo para el bloqueo se pensó en un principio que consistía en una reducción de la concentración local del calcio (Muller y Frinkelstein 1974). Estos iones podían también actuar compitiendo por un mismo punto del canal (Hagiwara y col 1974). Más tarde se dió más importancia a una posible acción reguladora ejercida a través de sitios externos del canal (Kostyuk y col. 1983).

Se ha podido observar también que las alteraciones en las corrientes de calcio

eran distintas según el tipo de célula, por lo que se dedujo que existían distintos tipos de canales Ca^{++} VOC. Hasta la fecha se han podido demostrar tres subtipos de canales (L,N,T), si bien la existencia de uno de ellos, el llamado canal N, esta en discusión. En la Tabla III (pág. 27) se muestra un resumen de las características de cada uno de estos subtipos de canal.

* El canal L debe su nombre a la expresión "Long- lasting" (larga duración), o también "Large Ba^{++} conductance" (conductancia duradera al Ba^{++}) (Nowicky y col. 1985). Se ha aislado en corazón, músculo liso y neuronas. En su estudio con la técnica del parche de membrana, se ve que es muy sensible a la dilución del componente citosólico tras sucesivos lavados, defosforilándose y por tanto inactivándose en dos o tres minutos. Para evitar esto se introduce en la micropipeta una disolución que aparte de los componentes normales contenga tres moléculas de ATP, junto a su unidad catalítica protein kinasa A y EGTA.

Diversos autores (Tanabe y col. 1987, Catterall 1988, Shearman y col. 1989), señalan que el canal L en el músculo esquelético está compuesto de cinco polipéptidos : $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$; teniendo el polipéptido α_1 un peso molecular de 165-175 kD, y siendo su función análoga al polipéptido α_1 del canal del Na^+ , ya que es el que posee el receptor para la apertura del canal. Los pesos moleculares de los restantes polipéptidos son para estos mismos autores de 143-170 kD para el α_2 , 54 kD para el β , 30 kD para el γ y 27 kD para el δ .

* El canal T debe su nombre a la expresión "Transient" (tránsito) , o también "Tiny Ba^{++} conductance" (minúscula conductancia al Ba^{++}) (Nowicky y col. 1985). Se aisló primeramente en células de ganglios de raíz dorsal. Tiene una estructura similar al canal L, pero con mínimas alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α_1 (Shearman 1989).

* El canal N, inicialmente significaba "No L No T", aunque actualmente debe su nomenclatura a la localización "Neuronal" (Yaary y col. 1987, Spedding 1987), habiéndose aislado en sinapsis de nervios terminales.

Los distintos tipos de canales tienen un comportamiento diferente como respuesta a las diversas toxinas con que se pueden tratar, lo cual sirve para su diferenciación. De la serpiente australiana Taipan (*Oxyuranus S. Scutellatus*), se extrae la neurotoxina TaiCatoxina (TCX: T de Taipan, C de calcio y X de toxina), que tiene la propiedad de bloquear el canal L en el músculo cardíaco de formas

reversible y específica, pero no el canal T (Brown y col. 1987). La w-CgTx o w-conotoxina o toxina del caracol "*Conus geographus*", es un péptido caracterizado por Olivera y col.(1984), quién la llamó "*w-VIA Conus geographus toxina*". Este péptido bloquea los canales L y N pero no los T. Además los canales L que bloquea son los situados en neuronas (L_n), y no los situados en músculo (L_m) por lo que se deduce que existe una heterogenicidad en los canales L, existiendo posiblemente varios subtipos (Miller 1987).

TABLA III

CARACTERÍSTICAS DE LOS SUBTIPOS DE CANALES Ca⁺⁺ VOC

	(L)	(T)	(N)
Conductancia	20-25 pS	7-8 pS	13 pS
Activación	- 10 mV	- 50 mV	---
Pico	+ 20 mV	- 10 mV	---
Inactivación	lenta, incompleta	rápida, completa	rápida
Permeabilidad	Ba ⁺⁺ >Sr ⁺⁺ >Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺ &Sr ⁺⁺ &Ba ⁺⁺	Ba ⁺⁺ >Ca ⁺⁺
Estabilidad	lábil	estable	---
Agonista	{ BAY K 8644 CGP 28392	---	---
Antagonistas orgánicos	{ 1-4 DHP w-Cg Tx (en neuronas pero no en célula muscular) Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	w-Cg Tx (débilmente)	w-Cg Tx
Antagonistas Inorgánicos	{ Cd (20 μM)	Cd > 200 μM Ni (0,1 mM) (poca sensibilidad)	Cd (20 μM)

(Construida con datos tomados de McCleskey y col. 1986, Hofmann y col. 1987, Wagner y col. 1987, Shearman y col. 1989).

1.3.- AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DEL CALCIO

El término antagonista del calcio (AnCa) fue introducido simultáneamente por dos autores al final de la década de los 60. Godfraind (Godfraind y Kaba 1969 a, b) introdujo este concepto trabajando en músculo liso vascular, y Fleckenstein (Fleckenstein y col. 1967, 1969) lo hizo trabajando en músculo cardíaco. Este último autor estableció que para que un fármaco pueda ser considerado como AnCa, debía reunir al menos estas dos propiedades:

- Inhibir la corriente lenta del calcio de forma dosis dependiente.
- Que esta inhibición pueda ser revertida al administrar un exceso de calcio.

Sin embargo etimológicamente el término AnCa no era el más preciso para los fármacos que cumplan estos requisitos, y a lo largo de la década de los 70 se introducen otras denominaciones como la de "bloqueantes de la entrada del calcio" o "bloqueantes del canal del calcio", etc. No obstante, el término AnCa había quedado acuñado, siendo el de uso más corriente. Por este motivo la OMS en 1985 forma un comité de expertos (farmacólogos, cardiólogos y neurólogos) presidido por Paoletti R., y recomienda el empleo del término AnCa sobre el resto de las expresiones (Vanhoutte y Paoletti 1987, Paoletti y Govoni 1987).

Los AnCa no forman un grupo homogéneo de fármacos. De igual forma que ha existido una fuerte controversia sobre como se debían denominar, existen múltiples clasificaciones de estos compuestos basadas en la diversidad de su estructura química, su potencia y su mecanismo de acción, tanto desde el punto de vista farmacológico como clínico. En esta Tesis se expone la clasificación de Godfraind (Godfraind y col. 1986, Godfraind 1987), por ser a nuestro parecer la más completa (Tabla IV). Esta clasificación incluye un amplio grupo de fármacos bajo el epígrafe "moduladores de los canales del calcio", dentro de los cuales no sólo se incluyen los AnCa, sino fármacos con actividad de agonistas del calcio (AgCa), así como otros fármacos que bloquean la utilización del calcio actuando a nivel intracelular. Sin embargo, como simplificación de esta clasificación se puede utilizar por sentido práctico la propuesta por Spedding (Spedding y Cavero 1984), que agrupa a los compuestos según su liposolubilidad en tres grupos (Tabla V).

TABLA IV

MODULADORES DE LOS MOVIMIENTOS DEL CALCIO

Ⓐ INHIBIDORES: ANTAGONISTAS DEL CALCIO

1.- AGENTES QUE ACTUAN A NIVEL DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

1.A.- Bloqueantes de la entrada de Ca⁺⁺

GRUPO I: Bloqueantes selectivos de entrada de Ca⁺⁺

SUBGRUPO I.A: Bloqueantes selectivos del canal lento de Ca⁺⁺ en miocárdio:

Fenilalquilaminas: verapamil, galopamil(D 600); y en investigación: anipamil, desmetoxiverapamil(D 888), emopamil, falipamil(AQ-A-39), ronipamil.

Dihidropiridinas: nifedipina, nicardipina, nilodipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, ryosidina; y en investigación: anulodipina, azodipina, dazodipina (Py 108-068), felodipina, flordipina, FR 7534, FR 34235, lodipina, isrodipina, mesudipina, ni(1)vadipina, oxidipina, PN 200-110, riodipina.

Benzotiazepinas: diltiazem; y en investigación: fostedil(KB-944).

SUBGRUPO I.B: Agentes sin acción detectable en el canal lento de Ca⁺⁺ del miocárdio:

Difenilpiperazinas: cinarizina y flunarizina.

GRUPO II: Bloqueantes NO selectivos de entrada de Ca⁺⁺

SUBGRUPO II.A: Agentes que actúan a similar concentración en el canal del Ca⁺⁺ y en el canal rápido de Na⁺:

Bencyclane, bepidril, caroverina, etafenona, fendilina, lidoflazina, perhexilina, prenilamina, SKF 525-A, terodilina, tiapamil.

SUBGRUPO II.B: Agentes que interaccionan con canal del Ca⁺⁺ teniendo otro sitio de acción principal:

Incluye una amplia variedad, desde agentes que actúan en el canal del Na⁺ (anestésicos locales, fenitona); en receptores de catecolaminas (benextramina, nicergolina, fenoxibenzamina, fenotiazinas, pimozina, propanolol, WB- 4101, derivados de yohimbina); en receptores opiáceos (loperamida, fluperamida); en fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (aminona, cromoglicato, papaverina); barbitúricos; ciproheptadina; indometacina; reserpina.

1.B.- Inhibidores del intercambio sodio-calcio: Derivados de amiloride.

2.- AGENTES QUE ACTUAN DENTRO DE LA CELULA.

2.A.- Actúan en retículo sarcoplásmico: Dantrolene, TMB-8.

2.B.- Actúan en mitocondria: Rutenio rojo.

2.C.- Antagonistas de Calmodulina:

Fenotiazinas: trifluoroperazina, clorpromazina

Derivados del naftaleno: W7

Anestésicos locales: dibucaína

Antagonistas de dopamina: pimozide, haloperidol

Calmidazolium (R 24571)

ⓑ FACILITADORES

1.- AGENTES QUE ACTUAN A NIVEL DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

Agonistas del calcio:

Dihidropiridinas: BAY K 8644, CGP 28392, YC 170

2.- AGENTES QUE ACTUAN EN RETICULO SARCOPLASMICO.

Inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃).

Cafeína.

3.- IONOFOROS.

A 23187, Iomicin.

(Tomada de Godfraind, 1987)

TABLA V

CLASIFICACION DE LOS PRINCIPALES ANTAGONISTAS DEL CALCIO

GRUPO 1.- Dihidropiridinas

- Nifedipina
- Nimodipina
- Nitrendipina
- Nicardipina

GRUPO 2.-

- Verapamil
- Galopamil
- Diltiazem

GRUPO 3.- Difenilalquilaminas

- Cinarizina
- Flunarizina
- Fendilina
- Trifluoroperazina
- Pimozide

Los grupos se clasifican por la liposolubilidad de los compuestos, de menor (Grupo 3) a mayor (Grupo 1).

(Tomada de Spedding y Cavero, 1984)

En esta Tesis se han utilizado dos dihidropiridinas moduladoras de los movimientos del Ca^{++} a nivel de la membrana plasmática: (Nifedipina y BAY K 8644), y un compuesto que actúa como inhibidor del Ca^{++} intracelular a nivel del retículo sarcoplásmico (TMB-8). En la Figura 6 se pueden ver las fórmulas estructurales de estos compuestos. Los tres figuran en la clasificación de Godfraind (Tabla IV, págs. 29 y 30).

La nifedipina (1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato dimetilo), fue sintetizada por los Laboratorios Bayer en 1969 con el nombre inicial de BAY A 1040, y caracterizada como potente AnCa por Fleckenstein y col. (1970). No posee ningún carbono asimétrico, siendo por tanto un compuesto quiral.

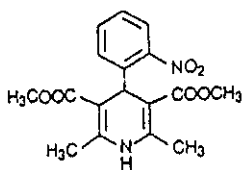
El BAY K 8644 (1,4-Dihidro-2,6-dimetil-3-nitro-4-(2-trifluorometilfenil)piridina-5-carboxilato metilo), fue sintetizado al azar por los Laboratorios Bayer cuando probaban derivados fluorados de la nifedipina, y fue caracterizado como AgCa ya que promueve la entrada de este ión por canales VOC, estimulando la contracción tónica vascular y aumentando la fuerza de la contracción cardíaca (Schramm y col. 1983 a y b, Schramm y col. 1985). Posee el carbono 4 asimétrico, y por tanto tiene dos enantiómeros: uno dextrógiro (+) y otro levógiro (-), o "R" y "S" respectivamente según la nomenclatura IUPAC.

Si se observa la estructura tridimensional de la nifedipina y el BAY K 8644 tal y como se representan en la Figura 7, se comprueban las escasas diferencias que mantienen ambas moléculas.

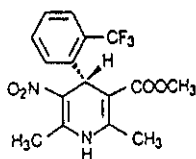
En general, las DHP que poseen carbono asimétrico, es más potente la configuración levógira (-) que la dextrógira (+). En el caso del BAY K 8644 el compuesto S (-) se muestra como AgCa mientras que el R (+) se muestra como AnCa (Franckowiak y col. 1985, Toward y Schramm 1985, Schramm y col. 1986, Vaghy y col. 1987).

El TMB-8 (8-(N,N-dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato), fue sintetizado y caracterizado por Malagodi y Chiou (1974 a, b), al hacer reaccionar el dietilamino octanol con el 3,4,5- trimetoxibencil clorhidrato, de acuerdo con el método descrito por Sastry y Lasso (1958). Pertenece a una serie de derivados trimetoxibenzoato estudiados por sus propiedades relajantes musculares. Estos compuestos parecen interferir con el proceso contráctil, actuando en un paso subsiguiente a la activación en la membrana, que sería común para la contracción inducida por agentes

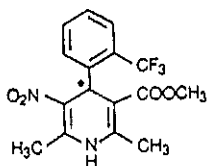
específicos y no específicos. Dentro de los derivados trimetoxibenzoato, se ha demostrado que cuando la longitud de la cadena alifática intermedia aumenta, resulta mayor la potencia de los compuestos, incrementándose los efectos bloqueantes de la contracción inducida en músculo liso por una amplia variedad de agentes contracturantes. El compuesto TMB-8 resulta uno de los derivados más extensamente investigados por sus efectos relajantes musculares, y se caracteriza como un inhibidor de la movilización del calcio desde los depósitos intracelulares en el músculo esquelético y en el músculo liso (Malagodi y Chiou 1974 a y b, Chiou y Malagodi 1975). En músculo esquelético inhibe la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, bloqueando en forma competitiva el efecto de cafeína. En músculo liso aunque su mecanismo de acción no se ha clarificado completamente, probablemente interferiría también con la utilización de calcio intracelular. El TMB-8 figura como antagonista del calcio intracelular en la clasificación de Godfraind (Table IV), y se ha propuesto como un instrumento útil de estudio en los mecanismos de contracción-relajación muscular.



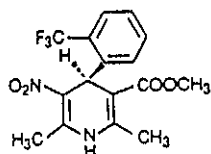
NIFEDIPINA



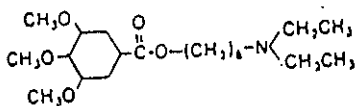
R(+)



BAY K 8644



S(-)



TMB-8

FIGURA 6.- Estructura química de la nifedipina, BAY K 8644 con sus dos enantiómeros R(+) y S(-), y TMB-8.

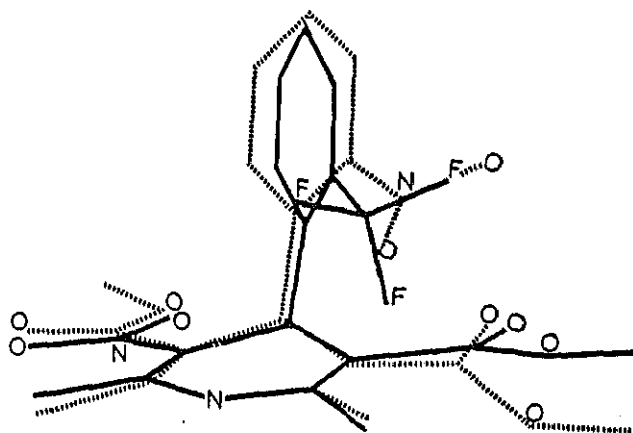


FIGURA 7.- Representación tridimensional de la molécula de nifedipina (.....) y S(-)BAY K 8644 (—) determinadas por técnicas de difracción de rayos X. N = átomo de nitrógeno, F = átomo de flúor. (Tomada de Schramm y col., 1986).

Los AnCa tienen una gran selectividad tisular. Esta propiedad hace que un fármaco actúe sobre un determinado tejido, permitiendo que se reduzcan los efectos secundarios indeseables sobre otros tejidos, y marcando unas expectativas de usos terapéuticos muy amplios y variados como se describirá en párrafos posteriores. Esta selectividad tisular de los AnCa es dosis-dependiente, de forma que si se aumenta la concentración puede no ser tan evidente y afectar a otros tejidos.

En general, las DHP actúan selectivamente sobre los vasos sanguíneos produciendo vasodilatación, sin afectar al miocardio ni alterar la función del músculo esquelético. La nifedipina tiene un efecto sobre miocardio a las dosis terapéuticas, que es más bien producto de una taquicardia refleja por la vasodilatación que produce, que una consecuencia de un efecto directo. Dentro de las DHP, algunas producen una vasodilatación no selectiva en todos los lechos vasculares, como es el caso de la nifedipina y nitrendipina, mientras que otras son selectivas de determinados lechos vasculares como la nisoldipina que actúa sobre vasos sanguíneos coronarios, o la nimodipina que actúa sobre vasos cerebrales (Godfraind y col. 1987 a y b, Gelmers 1987).

Otros dos AnCa muy utilizados en la clínica como son el verapamilo y el diltiazem, muestran una selectividad equipotente para miocardio, tejido de conducción auriculoventricular y vasos sanguíneos.

Las DHP son fármacos insolubles en agua y que por tanto no se ionizan, siendo la vía de acceso que usan para llegar al receptor específico del canal doble: a través de la luz del canal y por medio de su disolución en los lípidos de la membrana (Kokubun y Reuter 1984). Además de esto, las DHP se fijan con alta afinidad en tejidos parcialmente despolarizados, y como el potencial de reposo transmembrana del músculo liso vascular es de -60 mV a diferencia de los -90 mV del músculo cardíaco, se facilita la fijación en aquel y no en este (Cauvin y col. 1984). El verapamilo y el diltiazem se ionizan y acceden a su receptor a través de la luz del canal cuando este se encuentra abierto, mostrándose incapaces de atravesar la membrana. Se favorece su fijación en tejidos que tienen despolarizaciones repetitivas, como es el tejido de conducción cardíaco y el miocardio (Bolton y col. 1983).

Desde el punto de vista de la investigación se distinguen cinco niveles sobre los que actúan los AnCa, pudiendo nosotros mediante distintas técnicas medir los

efectos cualitativos que producen estos fármacos. Es la llamada cascada farmacoterapéutica que se expone en la Tabla VI (Godfraind 1987).

TABLA VI.

CASCADA FARMACO TERAPEUTICA DE LOS MEDICAMENTOS

	<u>Nivel de acción farmacológico</u>	<u>Efecto cualitativo</u>
I.-	Molecular	Afinidad por canal Ca^{++}
II.-	Celular	Cambios de flujo de Ca^{++} , potenciales de acción
III.-	Tejido (in vitro)	Efecto inotrópico y cronotrópico negativo, relajación de músculo liso
IV.-	Orgánico (in vivo)	Alteraciones hemodinámicas (ECG, tensión arterial...)
V.-	Enfermedad Clínica	Efecto antianginoso y antihipertensivo

Clinicamente los AnCa tienen unas aplicaciones sobre una serie de procesos patológicos, cuyo resumen describiremos someramente a continuación (Tamargo 1986, Artalejo y García 1987, Tamargo y Delgado 1987, Nayler 1988):

* Isquemia de miocardio : Los AnCa tienen una serie de efectos sobre la célula cardíaca que les hace ser usados en el infarto de miocardio. Se tienen pruebas del papel protector que ejercen los AnCa, siempre que el compuesto se haya introducido antes del episodio isquémico, y el paciente no tenga la función ventricular izquierda severamente comprometida. Este efecto beneficioso se debe fundamentalmente al ahorro de energía que producen los AnCa, junto con el efecto vasodilatador coronario, la inhibición de la agregación plaquetaria, el enlentecimiento de la entrada de Ca^{++} y la atenuación del exceso de noradrenalina que se produce en estos cuadros.

* Angina de pecho : Los AnCa constituyen un tratamiento eficaz en el angor pectoris, independientemente de que se trate una angina de Prinzmetal, de esfuerzo o bien inestable. El mecanismo por el que resultan beneficiosos en estos cuadros es múltiple, y están implicados tanto la reducción del tono vasomotor y prevención del espasmo arterial coronario, la reducción de la carga de trabajo cardíaco y la inhibición de la agregación plaquetaria, e incluso en tratamientos a largo plazo el enlentecimiento de la aterogénesis.

* Arritmias : Los AnCa tienen un efecto beneficioso fundamentalmente sobre dos tipos de arritmias : taquicardias supraventriculares y las arritmias provocadas por la isquemia y reperusión. Las taquicardias supraventriculares (taquicardia, fibrilación y flutter auriculares...), son controladas por los AnCa (con la excepción de las dihidropiridinas), debido a la depresión que ejercen sobre la actividad eléctrica del nodo sinusal, y al enlentecimiento de la conducción del nodo auriculoventricular. Sobre las arritmias provocadas por la isquemia y reperusión, todos los AnCa tienen un efecto beneficioso. Su mecanismo de acción es indirecto, como consecuencia de la capacidad ahorradora de energía que tienen estos compuestos, que permite que funcione con normalidad la bomba Na^+/K^+ y por tanto que no se acumule exceso de K^+ en el exterior favoreciendo la excitabilidad eléctrica. Además, al impedir la entrada en exceso de Ca^{++} , impide el estado arritmogénico que se produciría al activar la salida de K^+ y acortar la duración del potencial de acción.

* Isquemia cerebral : Los AnCa que atraviesan la barrera hematoencefálica y que actúan preferentemente sobre los vasos sanguíneos cerebrales (el prototipo es la

nimodipina), son útiles en el tratamiento de los ACV (accidente cerebro vascular), particularmente si se administran en las fases iniciales del cuadro. El mecanismo de acción es por la vasodilatación cerebral que producen, lo cual mejora el suministro de sustratos que llegan a la zona, y favore la eliminación de metabolitos tóxicos, agentes espasmogénicos y exceso de H^+ que se produce, acelerando la recuperación metabólica. Además, el bloqueo del Ca^{++} previene el vasospasmo secundario.

* Hipertensión : Los AnCa se utilizan como uno de los más potentes fármacos que se dispone en la actualidad para reducir la morbi-mortalidad producida por la hipertensión arterial. El efecto normalizador de la tensión que tienen los AnCa, lo realizan sin alterar ni los lípidos ni la glucosa del plasma, sin retener Na^+ ni agua, sin alterar el sistema renina-angiotensina, ni causar retención de ácido úrico. Además, ejerce un efecto protector sobre vasos sanguíneos, disminuyendo la velocidad de desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Estas propiedades clínicas descritas están actualmente demostradas y fuera de duda, dejan sin embargo un mecanismo de acción menos claro. Posiblemente el papel hipotensor se deba a la combinación de varios mecanismos como son la reducción del flujo de iones Ca^{++} a través de canales tipo L, así como a disminuir la respuesta vasoconstrictora de la angiotensina II, y a la atenuación de las respuestas a los estímulos por adrenorreceptores α_1 y α_2 .

* Insuficiencia cardíaca congestiva : Los AnCa derivados de las dihidropiridinas son los más indicados en estos cuadros. El mecanismo de acción se debe a que la vasodilatación produce una disminución de las resistencias vasculares periféricas, disminuyendo la sobrecarga y mejorando la función ventricular. Su uso debe ser acompañado de una cuidadosa monitorización de la tensión arterial para evitar estados de hipopertensión.

* Miocardiopatía hipertrófica ; El verapamil es el AnCa de elección. Su eficacia reside en su capacidad de mejorar la relajación diastólica, mantener la perfusión coronaria y posiblemente por deprimir la contratilidad.

En la Tabla VII se muestra un resumen de las aplicaciones clínicas de los AnCa basado en una clasificación de la OMS (Paoletti y Govoni 1987, Vanhoutte y Paoletti 1987).

TABLA VII

APLICACIONES CLINICAS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO PROPUESTAS POR
EL COMITE OMS

NIVEL DE PRUEBA / ENFERMEDAD	USO PREFERENTE (▲)	NIVEL DE USO (●)
(A) BUENO/		
<u>Cardiovascular</u>		
Angina de esfuerzo	I,II,III,V	+++
Angina de reposo:		
Angina estable	I,II,III	+++
Angina de Prinzmetal	I,II,III	+++
Arritmias:		
Taquicardia supraventricular	I,III	+++
Flutter y fibrilación auricular	I,III	++
Hipertensión	I,II,III	+++
<u>Neurológico</u>		
Profilaxis de la migraña	II,IV	++
Vértigo (★)	IV	+++
(B) REGULAR/		
Miocardiopatía hipertrófica	I	++
Incompetencia valvular/fallo cardíaco	II,III	+
Vasoespasmo cerebral secundario a hemorragia subaracnoidea	II	++
Cardiomegalía	I,II,III	+
Fenómeno de Raynaud	I,II,III,IV	++
(C) EN INVESTIGACION/		
Protección del infarto de miocárdio:		
Reducción del tamaño del infarto	I,II,III	+
Arritmia ventricular postinfarto	I,II,III	+
Hipertensión pulmonar primaria (■)	II	
Protección cerebral contra la anoxia y la isquemia	I,II,IV	+
Epilepsia	IV	+
ACVT	I,II,IV	++
Isquemia de pierna	IV	++
Dismenorrea	II	+

(▲) I= Verapamilo y afines; II= Nifedipina y afines;
III= Diltiazem y afines; IV= Flunarizina y afines; V= Prenila
mina y afines.

(●) Nivel de uso: +++ uso muy común, ++ uso frecuente, + uso
poco frecuente.

(★) El mecanismo de acción es desconocido.

(■) También tiene aplicación en otros desordenes pulmonares.

(Tomada de Paoletti y Gonovis, 1987)

1.4.-IMPORTANCIA DEL ION CALCIO PARA LA CONTRACCION CELULAR.

Sidney Ringer puso de manifiesto en el siglo pasado la importancia que tiene el ión Ca^{++} en la iniciación y mantenimiento de la actividad contráctil cardíaca (1882). Comprobó que sólo se podía mantener la contracción muscular de un corazón de rana aislado, si el medio que bañaba el órgano contenía iones Ca^{++} . A partir de esa fecha se hicieron múltiples investigaciones sobre los fenómenos que induce la actividad del ión Ca^{++} . Fleckenstein y col. en 1967 sugieren que el mecanismo de acción inotrópico y cronotrópico negativo de un nuevo fármaco que estaban ensayando (verapamil), no era el bloqueo de los receptores β -adrenergicos miocárdicos, sino el bloqueo de la entrada del ión calcio extracelular ($\text{Ca}^{++}_{\text{ext}}$) al interior celular, impidiendo así el acoplamiento excitación-contracción. Posteriormente Rougier y col. (1969) ya demostraron la existencia en células cardíacas de un "canal rápido" por el que penetra el Na^+ cuando se despolariza la membrana, y de un "canal lento" por donde penetran iones Ca^{++} que era el responsable del mantenimiento de la fase de meseta del potencial de acción cardíaco. Desde esta fecha, han sido múltiples las investigaciones hasta llegar a centrar en el ión Ca^{++} gran parte de las respuestas fisiológicas celulares, siendo desde luego el fenómeno contráctil una de las principales respuestas celulares en las que estará implicado.

Hasta aquí hemos descrito los mecanismos de transporte iónico entre el compartimento extracelular y el intracelular como suceso puramente físico de entrada y/o salida de iones, pero las consecuencias de estos mecanismos son la activación en las células de los segundos mensajeros que entran en juego como respuestas a múltiples estímulos (Ej. fármacos, toxinas...). Estos segundos mensajeros influyen en múltiples y variadas respuestas celulares, siendo precisamente la contracción-relajación muscular uno de los principales fenómenos en los que se encuentran implicados. Entre los principales segundos mensajeros destaca el propio ión Ca^{++} y para entender el proceso será fundamental conocer las transformaciones bioquímicas comprendidas en la vía de los fosfolípidos.

Desde hace más de tres décadas, diversos autores entre los que destacan Hokin y Hokin (1955) indican la importancia que tiene el hecho de que la activación de receptores muscarínicos colinérgicos por acetilcolina (ACh) aumente la

incorporación de fósforo inorgánico al ácido fosfatídico (PA) y al fosfatidil inositol (PI). Este fenómeno era además bloqueado por el antagonista muscarínico atropina, pero no por antagonistas nicotínicos como el d-tubocuramina en preparaciones de cerebro. Estos mismos autores llamaron "efecto fosfolípido" a este fenómeno que ha sido demostrado posteriormente en múltiples tejidos. Así Michell (1975) recopila una amplia variedad de tejidos (páncreas, adipocitos, tráquea, músculo liso de león, deferente, corazón, parótida, tiroides, hepatocito, células adrenales, leucocitos, linfocitos, ...), en los que como respuesta a diversos estímulos se formaba PI.

En 1974, Hokin-Neaverson en páncreas, y Jones y Michell en parótida de rata, usando isótopos radiactivos de ^{32}P , demuestran que el estímulo que realizan los diversos mediadores provoca la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana, y más concretamente la hidrólisis de los fosfatidil inositoles, como el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) (Figura 8).

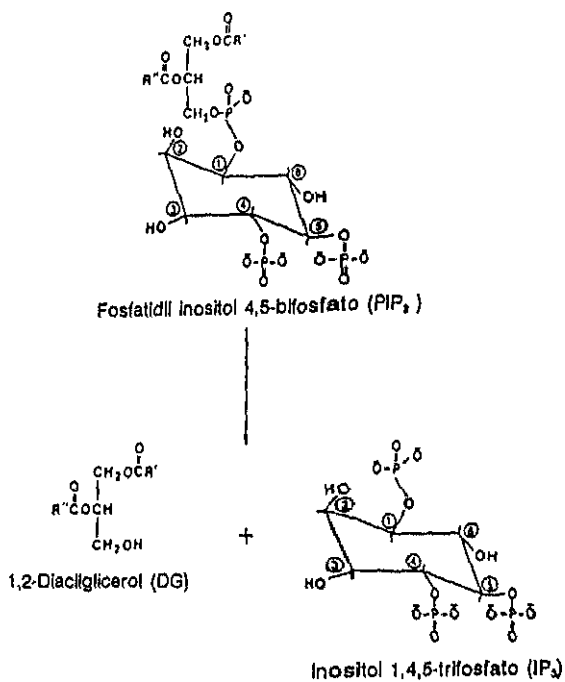


FIGURA 8.- Hidrolisis del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato (PIP₂). Si las posiciones 4 y 5 están libres tenemos la hidrolisis del fosfatidil inositol (PI), y si la posición 4 está ocupada por un grupo fosfórico quedando libre la 5 tenemos la hidrolisis del fosfatidil inositol 4 fosfato (PIP).

Los fosfatidil inositoles en la célula aparecen a nivel de la membrana celular y del citosol (Berridge 1984, Hokin 1985). El PI forma entre el 3 y 4.9% del total de fosfolípidos en cerebro de rata y músculo de iris respectivamente, y el PIP el 1.3 y 0.8% del total de fosfolípidos en las mismas preparaciones (Abdel-Latif 1986).

La formación de los fosfatidil inositoles (Figura 9, pág. 48) se produce a partir de la D-glucosa 6P que puede proporcionar el PA y el D-inositol. El PA en presencia del enzima citidil transferasa para ácido fosfatídico (CTP-PA) proporciona unos compuestos intermedios, que al unirse al D-inositol forman el PI. Todo este ciclo ocurre en retículo endoplasmático (Gouid y col. 1983, Parrier y Hokin-Neaveron 1984, Ghalayini y Eichberg 1985), y el PI es transportado por una proteína transportadora de PI hasta la membrana plasmática, (Somerharfu y col. 1983, George y Heimkomp 1985). Allí ocurre su fosforilación por ATP y dos kinasas específicas que existen en la membrana formandose el PIP y PIP₂ (Downes y Michell 1982, Berridge 1984). Existen dos fosfatasas que pueden dar la transformación en sentido inverso (Abdel-Latif 1986). La PI kinasa aparece aún en mayor concentración en lisosomas, aparato de Golgi y núcleo, y tiene en realidad menor concentración en membrana plasmática (Collin y Wells 1983, Jergel y Sundler 1983, Smith y Wells 1983, Cockcroft y col. 1985). La PIP kinasa se ha localizado en membrana plasmática existiendo allí mucha concentración, aunque también aparece en citoplasma y aparato de Golgi (Cockcroft y col. 1985, Lundberg y col. 1985). De todos modos la formación de PIP y PIP₂ partiendo de PI tiene lugar fundamentalmente en la membrana plasmática. Para Van Dongen y col.(1986) la incorporación de ³²P a membrana plasmática de hepatocitos para dar PIP y PIP₂ era respectivamente de 5 a 10 veces más por mg. de proteína y de 25 a 50 veces más por mg. de proteína, que en cualquiera de las otras fracciones subcelulares. La actividad de PI y PIP kinasas se estimula por Mg⁺⁺ y se inhibe por Ca⁺⁺, y al aumentamos la concentración de PIP₂ por un mecanismo de retroalimentación decrece la actividad de PIP kinasa (Van Rooijen y col. 1985).

El estímulo de un receptor en la membrana celular activa una fosfodiesterasa Ca⁺⁺-dependiente del tipo fosfolipasa C, y esta hidroliza el PI (o sus derivados fosforilados PIP y PIP₂) para dar diacilglicerol (DG) y los respectivos inositol fosfatos (Abdel-Latif 1986, Berridge 1987):

- * Inositol 1 fosfato (IP)
- * Inositol 1, 4 difosfato (IP₂)
- * Inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃)

Esta fosfolipasa C se encuentra en el citoplasma y en las membranas (Irvine y col. 1984, Wilson y col. 1984, Garff y col. 1984, Cockcroft y col. 1984, Crentz y col. 1985, Plantavid y col. 1986). No existe evidencia clara de que PI, PIP y PIP₂ sean hidrolizados por diferentes fosfolipasas C. Para Nishizuka y col. (1985) hay dos tipos de fosfolipasas C: la del tipo I que requiere concentraciones de Ca⁺⁺ 1 μ M, y la del tipo II que requiere concentración de Ca⁺⁺ 0.001 M a pH fisiológico. Ambas formas hidrolizan preferentemente el PIP. La fosfolipasa C humana se ha purificado y muestra su máxima actividad en presencia de una concentración 10⁻⁴ M de Ca⁺⁺. Está influida también su actividad por las variaciones del pH y por la presencia de Mg⁺⁺.

De los inositoles fosfato formados el más importante es el IP₃, que moviliza el Ca⁺⁺ de los depósitos intracelulares (Streb y col. 1983, Biden y col. 1986). La interacción del IP₃ formado, con los orgánulos intracelulares que tienen depósitos de Ca⁺⁺ (retículo endoplasmático, mitocondria), se produce por mediación de receptores específicos que existen en la membrana de estos orgánulos (Spat y col. 1986, Guillemette y col. 1987). El Ca⁺⁺ liberado de los depósitos, junto con el que penetra a través de los canales, actúa como mediador o segundo mensajero de múltiples respuestas celulares (Rana y Hokin 1990). Por otra parte, ya habíamos señalado que el IP₃ actuaba a nivel del canal del Ca⁺⁺ ROC activándolo (Triggie 1987).

Existen otras enzimas llamadas inositol polifosfatos fosfomonoesterasas que son fosfatasa encargadas de degradar los inositol polifosfatos hasta D-inositol, y fósforo inorgánico. Esta degradación se produce en la membrana plasmática y en el citoplasma, y es Mg⁺⁺-dependiente (Storey y col. 1984, Connolly y col. 1985). El litio inhibe potente y selectivamente a la IP fosfatasa y menos a las restantes (Sherman y col. 1981).

El DG que es el otro compuesto que se produce como consecuencia de la hidrólisis de los fosfatidil inositoles sigue tres rutas metabólicas distintas (Nishizuka 1988):

a) Es otra vez metabolizado vía lipasas a ácido araquidónico para la biosíntesis de eicosanoides.

b) Puede ser fosforilado con ATP en la membrana plasmática por el enzima DG-kinasa y regenera el PA cerrando de esta manera el ciclo.

c) Puede activar una protein-kinasa C y da diversas respuestas celulares.

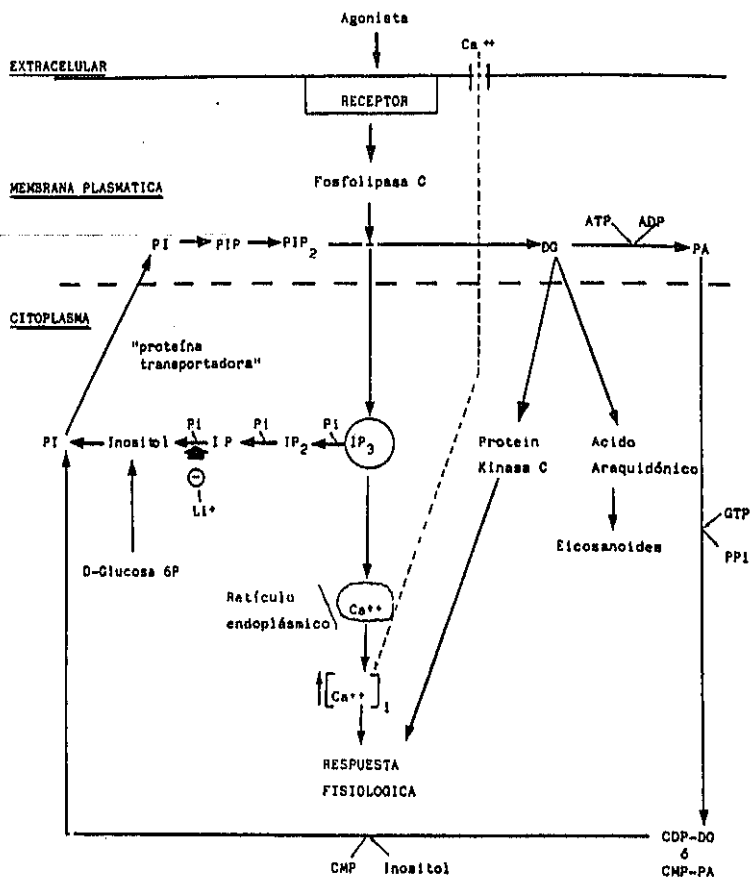


FIGURA 9.- Ciclo de los fosfatidil inositoles, basado en un esquema propuesto por Abdel-Latif (1986) con modificaciones. DG = 1,2 diacilglicerol; PA = ácido fosfatídico; PI = fosfatidil inositol; PIP = fosfatidil inositol 4 fosfato; PIP₂ = fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; IP = inositol 1 fosfato; IP₂ = inositol 1,4 bifosfato; IP₃ = inositol 1,4,5 trifosfato; Pi = fósforo inorgánico; PPI = pirofosfato inorgánico; GTP = guanosin trifosfato; CDP-DG = citidín difosfato-diacilglicerol; CMP-PA = citidín monofosfato-ácido fosfatídico; CMP = citidín monofosfato.

Cuando se produce un aumento del ión calcio intracelular (Ca^{++}_i) libre, bien sea por entrada a través de canales de la membrana plasmática o por salida desde los orgánulos intracelulares (retículo endoplasmático y mitocondria), se ponen en marcha una serie de procesos fisiológicos que dependiendo del tipo de célula pueden consistir principalmente en procesos de contracción o procesos de secreción. En el caso del músculo liso vascular este aumento de Ca^{++}_i libre ocasiona como respuesta una contracción teniendo lugar una serie de fenómenos que seguidamente describiremos.

En un corte transversal del músculo liso vascular se pueden ver con el microscopio electrónico fundamentalmente dos tipos de filamentos: los gruesos y los delgados. El filamento delgado está compuesto de dos proteínas: la actina y la tropomiosina. La actina es una proteína contráctil, globular, de cadena única, de peso molecular aproximado de 42 kD, y dispuesta en forma helicoidal en dos hebras alrededor de la tropomiosina. La tropomiosina es una proteína alargada, de peso molecular aproximado de 70 kD (Silver y Stull 1982). El filamento grueso está compuesto de miosina, proteína contráctil de molécula hexamérica formada por dos subunidades de alto peso molecular (cadenas pesadas), y cuatro subunidades de bajo peso molecular (cadenas ligeras). Las cadenas pesadas forman una cola espiral con dos regiones protuyentes o "cabezas", que contienen las zonas de unión a la actina. Los dos pares de cadenas ligeras de la miosina (CLM), tienen un peso molecular de 17 kD y 20 kD respectivamente. Es de particular interés esta última subunidad que se denomina cadena ligera P o cadena fosforilable, siendo capaz de captar cationes divalentes y desfosforilándose en forma calcio-dependiente.

Una vez que se produce el aumento de Ca^{++}_i libre, éste juega un papel esencial en la interacción entre la actina y la miosina, siendo el responsable de la contracción muscular a través de dos mecanismos. El más importante necesita que este Ca^{++} se fije a CMD, que como señalamos en el apartado 1.2.2 (pag. 13) es una proteína citoplasmática. Para Cheung (1982) y Winkler y col. (1987) la CMD está compuesta de una única cadena de 148 aminoácidos, de peso molecular 16700 D, que es resistente a pH ácidos y termoestable (no se altera a 100°C). La tercera parte de los aminoácidos que componen la cadena es del tipo glutamato o aspartato, que tienen como cadena lateral el grupo carboxilato con carga negativa, y a través de este grupo COO^- se une al ión Ca^{++} . La proteína carece de triptófano,

cisteína e hidroxiprolina, lo que le confiere una flexibilidad que es clave para su modo de acción, permitiéndole el cambio de estructura pasar de forma activa a inactiva y viceversa. La CMD se ha hallado en todas las células eucariotas, es decir células con núcleo, siendo muy semejante la secuencia de aminoácidos de unas a otras, y careciendo por tanto la proteína de especificidad de especie y tejido.

La CMD aparece plegada y tiene cuatro sitios de unión para el Ca^{++} (Figura 10).

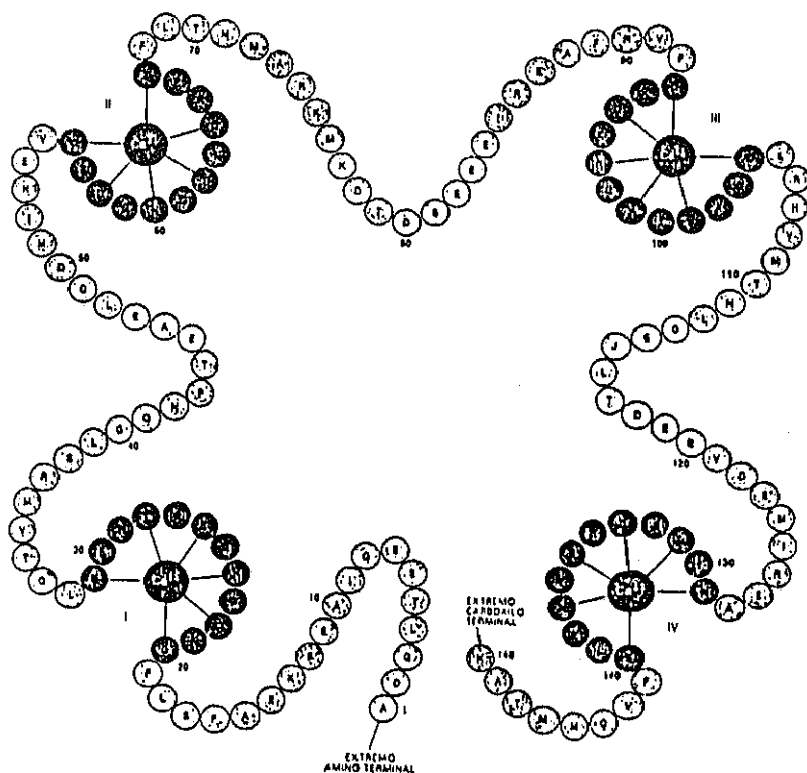


FIGURA 10.- Representación esquemática de la secuencia de la cadena de CALMODULINA de cerebro bovino, compuesta por 148 residuos de aminoácidos. Tiene 4 puntos muy similares en los que se une al ión Ca^{++} a 8 aminoácidos. A = Ala; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gll; H = His; I = lleu; K = Lis; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Glu; R = Arg; S = Ser; T = Treo; V = Val; Y = Tr. (Tomada de Cheung, 1982).

La afinidad de la CMD por el Ca^{++} es tal, que según la concentración intracelular del ión se une a él o no, condicionando esto su actividad. La concentración intracelular de CMD es variable pero en realidad esta no limita la velocidad enzimática, por lo que se deduce que la proteína se encuentra siempre en exceso. De esta forma, cuando se produce un aumento de Ca^{++} libre (alcanzándose una concentración aproximada de 10^{-6} M), ya sea por apertura de canales y entrada desde el exterior, o por salida desde los depósitos intracelulares, o por una combinación de ambos procesos, se produce un acoplamiento del ión Ca^{++} a la CMD en los puntos de unión. De los cuatro sitios de fijación descritos para el calcio, dos están unidos permanentemente al ión y el tercero y posiblemente el cuarto sean los encargados de captar la nueva entrada de iones Ca^{++} . De esta forma la CMD pasa de la forma inactiva a una forma activa de configuración nueva más compacta, y esta nueva forma activada ($\text{Ca}^{++}\text{-CMD}'$) se acopla a otro enzima que actúa como receptor. El enzima queda así activado produciendo la correspondiente respuesta. Por tanto, el mecanismo básico de acción de la CMD puede entenderse como un proceso reversible que tiene dos pasos (Winkler y col. 1987) :

- 1) $\text{Ca}^{++} + \text{CMD inactiva} \longrightarrow \text{Ca}^{++}\text{-CMD}' \text{ activa}$
- 2) $\text{Ca}^{++}\text{-CMD}' + \text{ENZIMA inactiva} \longrightarrow \text{Ca}^{++}\text{-CMD-ENZIMA}' \text{ activa}$

En la Figura 11 se muestra el esquema de activación y desactivación de la CMD.

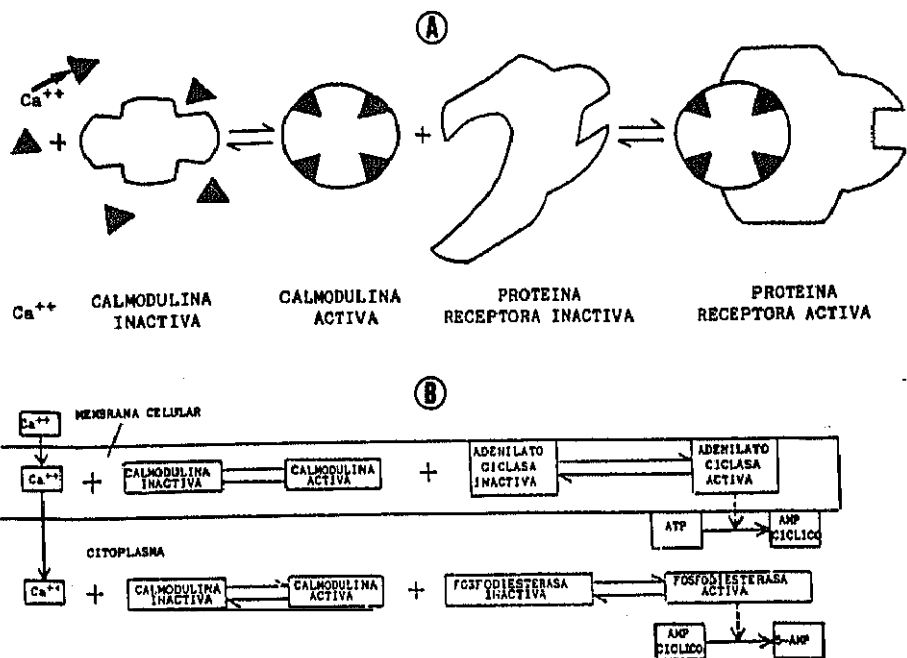


FIGURA 11.- A) Mecanismo de mediación de la calmodulina. Ni el ión calcio ni la calmodulina son activos por separado, pero la unión de cuatro iones cálcicos a la calmodulina cambia la conformación de esta y la activa. La calmodulina activada interacciona con otra proteína o enzima, cambiando la conformación de esta y activándola. Un factor importante de este proceso lo constituye la flexibilidad de la molécula de calmodulina.

B) Posible esquema de la activación secuencial de los enzimas adenilato ciclasa y fosfodiesterasa en el cerebro. La calmodulina de la membrana activada por la entrada de Ca^{++} , activa a su vez al adenilato ciclasa que cataliza a su vez el paso de ATP a AMP. Por su parte el aumento de Ca^{++} en el interior de la célula activa a la calmodulina, que a su vez activa a la fosfodiesterasa encargada de degradar el AMP, formado. Así pues, la calmodulina activa tanto el enzima de síntesis como el degradativo.

(Tomada de Cheung, 1982).

En realidad existen varias proteínas intracelulares que pueden actuar como receptores para el ión Ca^{++} . En el caso del músculo estriado el primer receptor de $\text{Ca}^{++}_{\text{m}}$ es la troponina C, mientras que en músculo liso y en filamentos de células no musculares el efecto del $\text{Ca}^{++}_{\text{m}}$ está mediado según lo descrito por la CMD. En el músculo liso la $\text{Ca}^{++}\text{-CMD}^*$ se une a la subunidad catalítica del enzima kinasa de la CLM formando un complejo holoenzimático activo que cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el complejo $\text{Mg}^{++}\text{-ATP}$ a la cadena ligera P (Vallet y col. 1981, Stull y col. 1982).

La fosforilación de la cadena ligera P estimula las interacciones actina-miosina, activando un enzima ATPasa-Mg^{++} presente en la miosina. Este enzima cataliza la hidrólisis del ATP y la interacción con la actina a través de puentes que provocan el deslizamiento de ambas moléculas y por consiguiente la contracción.

El enzima kinasa de la CLM fue purificado partiendo de diferentes preparaciones, y se vio que era una proteína de 125 - 130 kD completamente dependiente del complejo $\text{Ca}^{++}\text{-CMD}^*$ (Vallet y col. 1981, Stull y col. 1982). Este enzima es el que juega el papel principal en el proceso de contracción. Su papel en el proceso contráctil es claro, ya que puede demostrarse que cuando hay bajos niveles de concentración de $\text{Ca}^{++}_{\text{m}}$ y por tanto de complejo $\text{Ca}^{++}\text{-CMD}^*$, los valores encontrados de fosfato en la cadena ligera P varían entre 0.13 y 0.25 moles de fosfato/molécula, mientras que 30 a 60 segundos después de aplicar un agente contráctil en músculo liso intacto, el contenido de fosfato de la cadena ligera P oscila entre 0.65 y 0.75 moles de fosfato/molécula de cadena ligera P (Dillon y col. 1981, Silver y Stull 1981).

De todos modos como hemos ya señalado, en los filamentos finos, el $\text{Ca}^{++}_{\text{m}}$ puede regular por un segundo mecanismo la interacción actina-miosina sin necesidad de fosforilar previamente a la CLM.

Para que tenga lugar la relajación es necesario que se sustraiga $\text{Ca}^{++}_{\text{m}}$ libre por cualquiera de los siguientes mecanismos:

- * Incremento del secuestro de Ca^{++} por parte de los órganos de depósito.
- * Reducción del flujo de entrada de Ca^{++} al interior de la célula.
- * Incremento de la salida de Ca^{++} al exterior de la célula.

Se conocen algunos mecanismos concretos para conseguir derivar el Ca^{++} fuera del aparato contráctil, entre los que destacamos algunos. Así por ejemplo para Silver y Stull (1982) la activación de la adenilato ciclasa por estímulo β -adrenérgico, produce un aumento de AMP_c que estimula el enzima protein kinasa AMP_c dependiente. Este enzima produce una fosforilación de la kinasa de la CLM, con incorporación de hasta dos moles de fosfato por cada molécula de kinasa de la CLM. Esta fosforilación produce una marcada inhibición en la actividad enzimática, descendiendo de 10 a 20 veces la afinidad de la kinasa de la CLM fosforilada por el complejo Ca^{++} -CMD' (Conti y Adelstein 1981), produciéndose por tanto la relajación. Esta teoría se ve reforzada por el hecho de que si se inhibe la fosfodiesterasa (enzima que inactiva el AMP_c), aumenta el AMP_c y aumenta la relajación de la fibra.

Habíamos señalado que la fosforilación de la CLM era el mecanismo principal, pero no el único que producía contracción. De igual modo tienen que existir otros mecanismos que produzcan relajación aparte del descrito. Así la protein kinasa AMP_c dependiente estimula también la Na^+/K^+ ATPasa de las membranas, y en consecuencia entra K^+ y sale Na^+ en el músculo liso, poniéndose a su vez en marcha el mecanismo la entrada de Na^+ con salida de Ca^{++}_m que es expulsado fuera de la célula. Al producirse un descenso del nivel de Ca^{++}_m se produce lógicamente la relajación.

1.5.- RECEPTORES VASCULARES α -ADRENERGICOS

La división de los receptores adrenérgicos en receptores α y β se debe a Ahlquist (1948), quien tras un estudio con adrenalina (Ad), noradrenalina (NA) e isoproterenol, propone la existencia de estos dos tipos de receptores basándose en la distinta sensibilidad a los compuestos en estudio.

Los receptores β se subdividieron en β_1 y β_2 (Lands y col. 1967), según su localización en tejido cardíaco o en músculo liso y células glandulares respectivamente. Estos receptores β fueron los primeros estudiados debido a los efectos terapéuticos tan importantes que mostraron los β -bloqueantes sobre hipertensión, angina de pecho e isquemia de miocardio; y debido también a los efectos de los β -estimulantes en la terapéutica asmática. En contraste fue ya en la década de los setenta cuando se iniciaron los estudios sobre los receptores α . El conocimiento de los receptores α fue el resultado de los siguientes acontecimientos (Van Zwieten y Timmermans 1984):

- 1.- La introducción del concepto de receptores pre y postsinápticos.
- 2.- La clasificación de α adrenoceptores en los subtipos α_1 y α_2 .
- 3.- El descubrimiento de que los α adrenoceptores en el cerebro están relacionados con el efecto antihipertensivo de fármacos con actividad central, afines a clonidina, guanfacina y α -metil-DOPA.
- 4.- El desarrollo de la industria farmacéutica que consigue productos con gran selectividad como agonistas y antagonistas para receptores α_1 y α_2 , lo que permite la diferenciación de los efectos debidos a un tipo u otro de receptor.
- 5.- La introducción de técnicas de radioligandos para caracterizar los subtipos de receptores α_1 y α_2 .

La necesidad de introducir una nomenclatura similar a la de los receptores β , para los receptores α llevó a Langer (1974) a clasificar los receptores presinápticos como α_2 y los postsinápticos como α_1 . Pronto se demuestra que esta clasificación basada en el lugar anatómico en que se encuentran resulta inapropiada, puesto que difícilmente se podrían calificar de presinápticos los receptores α_2 adrenérgicos de las plaquetas (Grant y Scrutton 1979). Se hacía necesario una revisión de los

términos, y diversos autores entre los que destacan Langer (1981), Timmermans y Van Zwieten (1981, 1982) y Starke (1981), proponen una clasificación basada en la siguiente nomenclatura:

* Pre y postsináptico: indican la localización anatómica del receptor con respecto a la neurona y a la sinapsis.

* α_1 y α_2 : indican la preferencia del receptor por un determinado agonista o antagonista, en definitiva su afinidad química pero no su localización anatómica.

El receptor presináptico α está localizado a nivel de la membrana de la fibra postganglionar, próximo a las vesículas de las varicosidades (Figura 12). La excitación del receptor presináptico α adrenérgico, ya sea por agonistas endógenos neurotransmisores NA o Ad, o por agonistas exógenos como es el caso de fármacos α simpaticomiméticos, inhibe la liberación de NA de las vesículas.

El receptor postsináptico α está localizado en el órgano diana (Figura 12). A nivel vascular si se excita por un neurotransmisor o por un agonista ocasiona una vasoconstricción con aumento de la presión arterial (Reid 1981).

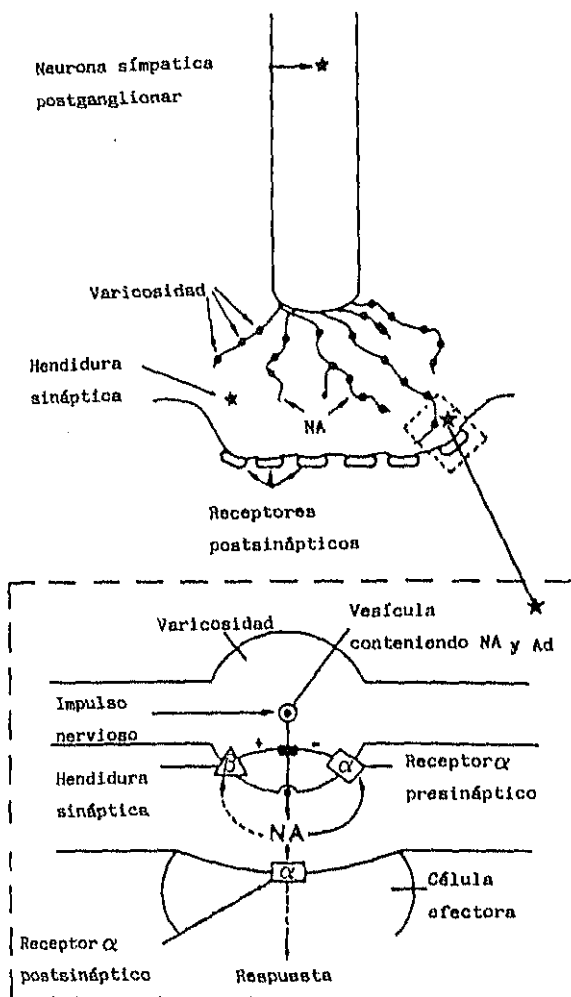


FIGURA 12.- Sinapsis adrenergica. La adrenalina (Ad) y noradrenalina (NA) se encuentran en las vesículas, y al llegar el estímulo nervioso a través de la neurona sináptica postganglionar se liberan a la hendidura sináptica, estimulando los distintos receptores postsinápticos que se encuentran en la célula efectora.

(Tomada de Van Zwielen, 1966).

Como hemos señalado la subdivisión de los adrenoceptores en α_1 y α_2 está basada en la diferente afinidad del receptor para agonistas y antagonistas, y no en la localización pre o postsináptica del receptor. En la Tabla VIII se pueden ver los fármacos agonistas y antagonistas de los receptores α_1 y α_2 .

TABLA VIII

FARMACOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE RECEPTORES α_1 Y α_2

<u>AGONISTAS α_1</u>	<u>ANTAGONISTAS α_1</u>
Metoxamina	Prazosín
Clrazolina	Doxazosín
Fenilefrina	Corinantina
Amidefrina	Labetalol
SKF 89749	Wb 4101
St 587	AR-C 239
Sgd 101/75	
<u>AGONISTAS α_2</u>	<u>ANTAGONISTAS α_2</u>
B-HT 920	Yohimbina
Clonidina	BDF 6143
B-HT 933 (Azepexole)	Rauwolscina
Uk-14.304	RX 781094
M-7	RS 21361
Xilacina	
Guanfacina	
Guanabenz	
Dopamina	
<u>AGONISTAS $\alpha_1 - \alpha_2$</u>	<u>ANTAGONISTAS $\alpha_1 - \alpha_2$</u>
Adrenalina	Fentolamina
Noradrenalina	Fenoxibenzamina
α -metil-noradrenalina	Tolazolina
Tramazolina	Piperoxan

(Construida con datos de Shepperson, 1982; Van Zwieten y Timmermans, 1984; Van Zwieten, 1986).

Los receptores presinápticos son fundamentalmente del subtipo α_2 adrenérgico y en menor proporción del subtipo α_1 (Kobinger y Pichler 1980). Los receptores postsinápticos son de ambos subtipos α_1 y α_2 , en una proporción que es muy aproximada de 1:1; produciendo tanto el estímulo de uno como de otro vasoconstricción. La localización de los dos subtipos postsinápticos respecto a la propia sinapsis es distinta (Figura 13). El receptor postsináptico α_1 , está localizado intrasinapsis, en contacto con los nervios "noradrenérgicos", siendo de esta forma rápidamente accesible al neurotransmisor NA. En el caso de que el órgano diana sea una arteria su posición anatómica se corresponde con la adventicia. El receptor postsináptico α_2 , se localiza más alejado de la zona de sinapsis, y en el caso de las arterias en la túnica íntima (Langer y Shepperson 1982, Van Zwieten 1986).

1.6.-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

1.6.-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Hemos visto en el apartado anterior que el estímulo de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos postsinápticos produce un incremento del tono vascular. Se sabe sin embargo desde hace tiempo, que sólo una parte de la vasoconstricción inducida por NA (agonista α_1 y α_2), depende de la presencia extracelular de iones Ca^{++} (Bohr 1963). Este hecho hizo que el grupo de Van Zwieten y Timmermans (Van Meel y col. 1981 a y b; Van Meel y col. 1982; Van Zwieten y col. 1982, 1984 y 1985; Timmermans y col. 1983 y 1984; Van Zwieten y Timmermans 1984; Wilffert y col. 1984 a,b; Van Zwieten 1986), estudiaran el papel que juega la entrada de Ca^{++} al interior celular en la vasoconstricción inducida respectivamente por el estímulo α_1 , y por el estímulo α_2 . Estos investigadores consideraron la utilización de AnCa como un valioso instrumento, para evaluar la importancia que tiene la entrada de Ca^{++} por canales VOC, en la contracción inducida por estímulo de los receptores α_1 y α_2 vasculares. Sus estudios con AnCa se centraron en ensayos llevados a cabo con la preparación de "pithed-rat". Este modelo experimental, que posteriormente describiremos y utilizaremos en la presente Tesis Doctoral, permite el estudio "in vivo" de efectos a nivel vascular periférico.

Los resultados iniciales del grupo de Van Zwieten y Timmermans con AnCa señalaron que las respuestas obtenidas por activación de receptores α_2 vasculares, eran sensibles a la inhibición de la entrada del Ca^{++}_{ext} , pero la participación del Ca^{++}_{ext} en la vasoconstricción por estímulo α_1 , podía variar para distintos agonistas. Posteriores estudios con radioligandos, permitieron a estos investigadores descartar que los AnCa pudiesen tener actividad significativa como bloqueantes α_2 . La inactivación del Ca^{++}_{ext} con etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA- Na_2), inhibió también en mayor grado las respuestas α_2 que las respuestas presoras inducidas por estímulo α_1 .

El siguiente esquema (Figura 14) tomado de Van Zwieten y Timmermans (1984) y Van Zwieten y col. (1984), es una representación de la membrana de la célula del músculo liso vascular. En él se aprecian las diferencias que podrían existir entre los sucesos que acontecerían como consecuencia de los estímulos α_1 y α_2 . Para estos autores, el estímulo de un adrenoceptor α_1 (por metoxamina) induce una despolarización en la membrana basada en flujos de Na^+ y K^+ , y este proceso no

es sensible a los bloqueantes de la entrada del calcio. Sin embargo el estímulo del adrenoceptor α_2 (por B-HT 920) se acompaña con una entrada de iones Ca^{++} que induciría la activación de las proteínas contráctiles intracelulares. El bloqueo de esta entrada de Ca^{++} con un AnCa prevendría la vasoconstricción, pero no impediría la formación del complejo agonista-receptor α_2 . En el esquema aparecen también los fármacos prazosín y yohimbina, capaces de bloquear selectivamente los receptores α_1 y α_2 .

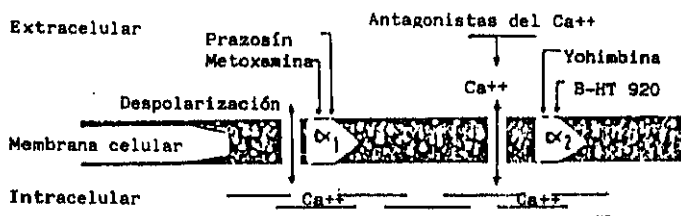


FIGURA 14.- Representación esquemática de la membrana celular de músculo liso vascular.

(Tomada de Van Zwieten y Timmermans 1984 y Van Zwieten y Timmermans 1984)

En los trabajos de Van Zwieten y Timmermans en "pithed-rat" cuando se estudiaban estimulantes mixtos como noradrenalina que tiene además de efectos α_1 , α_2 , efectos β , se utilizaban ratas tratadas con propanolol y rauwolscina para estudiar el efecto α_1 , o bien pretratadas con propanolol y prazosin para estudiar el efecto α_2 . Estos estudios parecieron también interesantes, ya que las catecolaminas circulantes endógenas estimularían los adrenoceptores α_1 y α_2 , en presencia de un AnCa se inhibiría el compuesto α_2 reduciéndose por lo tanto el tono vasoconstrictor. Este mecanismo probablemente contribuiría al efecto vasodilatador/hipotensor de los AnCa.

Para justificar la insensibilidad que presentan las respuestas vasopresoras α_1 , al tratamiento con AnCa se han propuesto distintas hipótesis. Unos investigadores (Reid y col. 1983, Ruffolo y Yaden 1984, Ruffolo y col. 1984) trabajando también en "pithed-rat" han sugerido la posible existencia de receptores α_1 de reserva que servirían como tampón ocasionando una insensibilidad de las respuestas presoras de los $Ag\alpha_1$ a los AnCa. Otra hipótesis alternativa es la que proponen Timmermans y col. en 1985 con dos modalidades de interacción en los receptores α_1 , estando una vinculada a la utilización del Ca^{++}_m como en el caso de la interacción en receptores α_2 , y estando la otra vinculada a la utilización del Ca^{++}_m . Diversos datos experimentales más recientes (Timmermans y Thoolen 1987; Timmermans y col. 1987; Mc Grath y O'Brien 1987; Richer y col. 1987) parecen confirmar que el efecto vasoconstrictor mediado por $Ag\alpha_2$ puede modificarse en presencia de los AnCa, pero los estudios con $Ag\alpha_1$ y AnCa continúan mostrando bastantes discrepancias de interpretación. Así algunos $Ag\alpha_1$, llamados "agonistas parciales" parecen capaces de comportarse como los $Ag\alpha_2$, y su efecto puede ser susceptible de bloqueo por los AnCa.

Para el grupo de Timmermans, la utilización de Ca^{++} en la vasoconstricción por $Ag\alpha_1$, podría tener claramente un doble origen: la entrada de Ca^{++}_m (sensible a los AnCa), y la movilización del Ca^{++}_m (insensible a los AnCa). Hay además que recordar que los receptores α_1 , se sabe que tienen propiedades farmacológicas diferentes en distintos tejidos. Podría existir una heterogeneidad de receptores α_1 . Para Hieble y col. (1986) según el tejido considerado, puede variar el modo en que se activan estos receptores y también la movilización del calcio cuando se estimulan. Se han propuesto en realidad subtipos de receptores α_1 , que controlarían

respectivamente la movilización del Ca^{++}_{in} y la entrada del Ca^{++}_{ex} . Han y col. (1987) señalan la existencia de dos subtipos de receptores α_{11} que causarían respuestas contráctiles a través de mecanismos moleculares distintos. Un subtipo α_{1b} estimularía la formación de derivados de IP_3 y causaría contracción con independencia del Ca^{++}_{ex} . El otro subtipo de receptor sería el α_{1a} que no estimularía de IP_3 y causaría contracción dependiente de la entrada de Ca^{++}_{ex} a través de canales dihidropiridina sensibles. Por otra parte, hay que señalar que los ensayos "in vitro" han resultado fundamentales para estudiar los mecanismos de utilización del Ca^{++} en la vasoconstricción inducida por estímulo α_1 . Los ensayos de Bohr en 1963 aludidos al comienzo de este apartado, señalaron ya la existencia de dos fases en las respuestas de aorta de conejo a NA. La primera parte de la respuesta contráctil (respuesta rápida), podría incluso deprimirse elevando la concentración de Ca^{++} en el medio extracelular, y era precisamente el componente de respuesta lenta el que quedaba inhibido al disminuir la concentración de Ca^{++} en el medio externo (Figura 15).

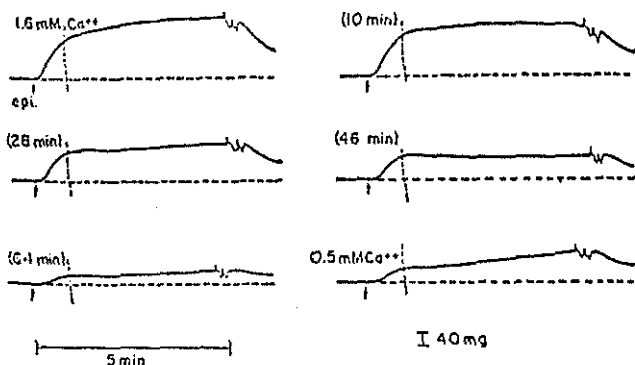


FIGURA 15.- Efecto de la depleción de Ca^{++} en la respuesta de NA en tiras helicoidales de aorta de conejo. Arriba a la izquierda la respuesta de una tira en Krebs normal. Las siguientes cuatro curvas muestran las respuestas después de mantener las tiras en Krebs sin Ca^{++} durante los tiempos señalados entre paréntesis. Después de 10 minutos en solución sin Ca^{++} el componente rápido (que precede la señal de raya discontinua) es ligeramente mayor, y el componente lento (la tensión desarrollada después de la señal de raya discontinua) está deprimido. Con 64 minutos de permanencia en solución sin Ca^{++} el componente lento queda virtualmente eliminado, y hay una depresión secundaria del componente rápido. Abajo a la derecha aparece la respuesta 3 minutos después de cambiar a una concentración 0.5 mM de Ca^{++} en el baño. Hay una recuperación del componente lento. Las irregularidades en las curvas de respuesta al final de los 5 minutos son artefactos del lavado. (Tomada de Bohr 1963)

Los resultados de Borh en aorta de conejo sugieren ya la existencia de una fuente distinta del Ca^{++}_{int} para la contracción vascular. La formación del complejo Ag α_1 -receptor inicia probablemente la liberación del Ca^{++} desde los depósitos intracelulares, principalmente retículo sarcoplásmico y cara interna del sarcolema. Estos conceptos parecieron confirmarse inicialmente con los estudios de flujos de Ca^{++} realizados por Godfraind en aorta de rata (Godfraind y Miller 1982; Godfraind y col. 1982). Dichos autores utilizando ^{45}Ca llegaron a la conclusión de que la estimulación de los receptores α_1 podía abrir canales de calcio, pero la estimulación de receptores α_1 inducía una despolarización en la membrana, y subsiguientemente la liberación de iones Ca^{++} de los depósitos intracelulares.

Posteriormente diversos estudios "in vitro" han confirmado que la utilización de Ca^{++}_{int} es esencial para la contracción vascular inducida por estímulo α_1 ; pero la hipótesis de Godfraind y col. también ha sido rebatida por otros autores. Los trabajos de Vanhoutte (1982) en vasos aislados, concluyen que el estímulo α_1 se acompañaba con entrada de Ca^{++}_{ext} siendo por tanto sensible al bloqueo de esta entrada de Ca^{++} con AnCa. Las diferencias entre los resultados de Godfraind y col. (1982) y los resultados de Vanhoutte y col. en el mismo año, podían ser debidos sobretudo a diferencias en los métodos de experimentación utilizados, ya que los lechos vasculares estudiados diferían sustancialmente. En realidad los estudios hasta la fecha llevados a cabo con agonistas α en vasos aislados proporcionan resultados dispares, dependientes no sólo del tipo de vaso estudiados sino también de la especie animal utilizada. Se han estudiado sobretudo las contracciones provocadas por NA en distintas arterias, resultando variable su inhibición por AnCa.

No ha sido sin embargo fácil hasta la fecha demostrar "in vitro" la importancia que tiene el Ca^{++}_{int} en la contracción vascular mediada por estímulo α_1 . En realidad, hay que señalar que hasta este momento ni siquiera ha sido fácil demostrar la participación de los receptores α_1 en las contracciones inducidas en vasos aislados por distintos agonistas. Los adrenoceptores de aorta de rata inicialmente se describieron como un subtipo aberrante de adrenoceptor α_1 , que combinaba características de ambas clases de receptores, los α_1 y los α_2 , sin pertenecer claramente a ninguno de estos subtipos (Ruffolo y col. 1980, 1981, 1982; Randrianisoa y col. 1981). Por otra parte se sugirió que en las venas podría existir mayor densidad de receptores postsinápticos α_1 que en las arterias y que los

receptores α en venas y arterias podían presentar características distintas (De Mey y Vanhoutte 1980; Hieble y Woodward 1984). La utilización de agonistas α muy selectivos ha permitido identificar "in vitro" receptores α , postsinápticos en las venas safena y femoral de perro, siendo mejores las respuestas en la vena safena (Sullivan y Drew 1980; De Mey y Vanhoutte 1981; Shepperson y Langer 1981; Curro y Greenberg 1983; Fowler y col. 1984; Flavahan y col. 1984, 1987; Cooke y col. 1985; Flavahan y Vanhoutte 1986; Hieble y col. 1986; Rhodes y Waterfall 1987). Otros tejidos vasculares en los que han podido ponerse de manifiesto la existencia de receptores α , son las venas y arterias mesentéricas caninas (Kou y col. 1984; Itoh y col. 1987), la arteria de la cola de la rata (Medgett 1983; Medgett y Langer 1986), la vena safena humana (Docherty y Hyland 1985) y las arterias digitales humanas (Moulds y Stevens 1984; Stevens y Moulds 1985; Stevens y Moulds 1986).

En la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado un estudio paralelo en "pithed-rat" y en anillos de aorta de conejo que podrá complementar los que hasta la fecha existen sobre utilización de Ca^{++} en la vasoconstricción adrenérgica. El modelo de "pithed-rat" nos permitirá el estudio en animal entero de efectos a nivel vascular periférico con aproximaciones más reales del efecto de los fármacos "in vivo". Por su parte, la aorta de conejo es junto con la aorta de rata uno de los modelos experimentales más utilizado para estudios vasculares "in vitro", y los datos en ella obtenidos permitirán una mejor interpretación del mecanismo de acción de los fármacos. En ambos modelos se ensayaron $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$, y la utilización de agonistas selectivos supondrá una ventaja sobre otros estudios llevados a cabo con fármacos menos selectivos, permitiendo establecer las diferencias que existen en los procesos subsiguientes a la activación de ambas clases de receptores. Así por ejemplo, podríamos señalar que la mayoría de los estudios en vasos aislados se han llevado a cabo utilizando NA como agonista adrenérgico. En nuestro estudio como $Ag \alpha_1$ selectivos hemos utilizado metoxamina y fenilefrina que son derivados feniletamina caracterizados por otros investigadores (Timmermans y col. 1983b; Van Zwieten y col. 1985; Timmermans y col. 1987) como agonistas α_1 totales con elevada actividad intrínseca e insensibles al bloqueo de la entrada de Ca^{++} por $AnCa$. Como $Ag \alpha_2$ selectivos hemos utilizado B-HT 920 y B-HT 933, dos derivados α_2 similares a clonidina. Los $Ag \alpha_1$ y los $Ag \alpha_2$ se ensayaron en distintas condiciones experimentales, y en presencia de fármacos que pueden modificar la

utilización de Ca^{++}_{ext} y de Ca^{++}_{int} . La administración de nifedipina, AnCa con selectividad vascular, nos permitirá bloquear la entrada del Ca^{++}_{ext} al interior celular. Hemos querido también utilizar en este estudio una dihidropiridina agonista, que promueve por el contrario la entrada de Ca^{++}_{ext} al interior celular. En 1984 Wilfert y col. señalaron que parecía posible distinguir a los $Ag \alpha_1$ de los $Ag \alpha_2$ por la modificación de su efecto presor en "pithed-rat" con el compuesto BAY K 8644. Esta dihidropiridina se comporta como $AgCa$, y servirá también en nuestro estudio para discriminar los agonistas adrenérgicos que necesitan mayor utilización de Ca^{++}_{ext} para su efecto vasoconstrictor.

Por último, en nuestro estudio utilizaremos también el compuesto TMB-8. Este fármaco, como se señaló en el apartado 1.3, se ha caracterizado como un inhibidor de la movilización del Ca^{++} desde sus depósitos intracelulares en músculo esquelético y en músculo liso (Malagodi y Chiou 1974 a y b, Chiou y Malagodi 1975), y se ha propuesto como instrumento útil en los estudios de mecanismo contracción-relajación muscular. El TMB-8 puede según la clasificación de Godfraind (1987, páginas 31 y 32) considerarse como un antagonista del Ca^{++}_{int} . En nuestro estudio el TMB-8 presumiblemente bloqueará la liberación de Ca^{++} desde sus depósitos intracelulares en músculo liso vascular, permitiéndonos así estudiar la participación del Ca^{++}_{int} en las respuestas vasoconstrictoras α_1 adrenérgicas.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- FARMACOS, METODOLOGIA GENERAL Y CONDICIONES DE TRABAJO.

Metoxamina ClH (Galoso Wellcome S.A)

L-Fenilefrina ClH (Sigma)

B-HT 920 2ClH (Boehringer Ingelheim)

B-HT 933 2ClH (Boehringer Ingelheim)

Nifedipina (Bayer)

(\pm)BAY K 8644 (Bayer)

TMB-8 ClH (Sigma)

Prazosfn ClH (Pfizer S.A.)

Yohimbina ClH (Sigma)

Heparina sódica (Bolzot)

Las fórmulas estructurales de la metoxamina, fenilefrina, B-HT 920 y B-HT 933 aparecen en la página 73; las de la nifedipina, BAY K 8644 y TMB-8 aparecen en la página 34.

Las concentraciones mencionadas en el texto y en las figuras hacen referencia a las formas indicadas arriba; es decir, el peso de las bases de nifedipina y BAY K 8644, y el peso de las sales de TMB-8 y los agonistas y antagonistas α . Las soluciones madre de todos los fármacos se hicieron diariamente. Para lograr una buena disolución de prazosfn se utilizó un agitador durante 20 minutos, manteniendo una temperatura de 55 °C durante este tiempo. Utilizamos solución salina (ensayos "in vivo") o agua bidestilada (ensayos "in vitro") para las soluciones madre de los agonistas y antagonistas , y utilizamos solución salina con un 10% de etanol o agua bidestilada con un 10% de etanol para las soluciones madre de nifedipina, BAY K 8644 y TMB-8. Partiendo de estas soluciones se hicieron las diluciones necesarias en solución salina o agua bidestilada. En el caso de nifedipina y BAY K 8644, la solución madre y las diluciones se realizaron inmediatamente antes de su uso, para evitar su degradación.

Las DHP son sustancias fotosensibles, especialmente si se encuentran en disolución. Se degradan fácilmente con la luz solar y los rayos UV, habiéndose incluso estudiado como repercute esta degradación en los trabajos "in vitro" (Mikkeisen y col.

1985). BAY K 8644 resulta algo más estable que nifedipina y la degradación se produce al reducirse el anillo 1,4 dihidropiridínico que pasa a piridina, con lo que el compuesto pierde actividad. Esto ocurre si se expone el compuesto a luz de longitud de onda menor de 450 nm, y por eso para trabajar con ellos se emplean lámparas de vapor de sodio, que dan una luz monocromática de 589 nm de longitud de onda, o en su defecto se puede emplear y así lo hemos hecho en esta tesis, un tubo fluorescente marca Philips, modelo TL'D 36W/16, cuyo espectro de emisión puede observarse en la Figura 16, que cumple las características descritas anteriormente.

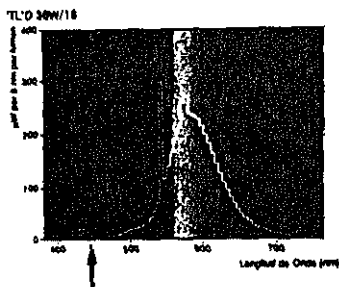
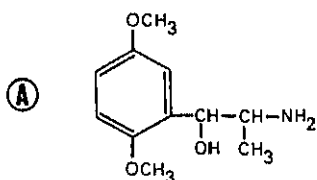
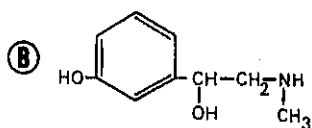


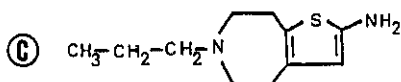
FIGURA 16.- Curva de distribución espectral de un tubo fluorescente TL'D 36W/16 (Cedita por Philips). En abscisas la longitud de onda (nm), y en ordenadas la intensidad del flujo luminoso medida en $\mu\text{W} / 5 \text{ nm} / \text{lumen}$. La flecha marca la longitud de onda correspondiente a los 450 nm, por debajo de la cual se degradarían las DHP si la lámpara emitiese flujo luminoso en esa zona del espectro.



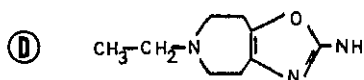
β -hidroxi- β -(2,5-dimetoxifenil)-isopropilamina



β -hidroxi- β -(3-hidroxiifenil)-etil-metilamina



6-ali-2-amino-5,6,7-tetrahidro-4 H-tiazolo-[4,5-d]azepina



2-amino-6-etil-4,5,7,8-tetrahidro-4H-oxazolo-[5,4-d]azepina

FIGURA 17.- Fórmula estructural de la metoxamina (A), fenilefrina (B), B-HT 920 (C), B-HT 933 (D)

En esta Tesis Doctoral se lleva a cabo un estudio del efecto sobre músculo liso vascular de dos $Ag\alpha_1$ selectivos (metoxamina y fenilefrina), y de dos $Ag\alpha_2$ selectivos (B-HT 920 y B-HT 933). Los agonistas α se ensayan "in vivo" e "in vitro" estudiándose la modificación de su efecto por BAY K 8644, nifedipina y TMB-8. La preparación que se utilizó para los ensayos in vivo" es la de "pithed-rat", valorándose en ella incrementos de presión sanguínea diastólica (PSD), y la que se utiliza para los ensayos "in vitro" es la de anillos de aorta de conejo, valorándose en ella la altura de las contracciones producidas. En la preparación de anillos de aorta de conejo se caracteriza además el efecto de BAY K 8644, nifedipina y TMB-8 sobre las contracciones provocadas por ClK, y en la de "pithed-rat" comenzamos nuestro estudio ensayando la administración del $AgCa$ y el $AnCa$ por distintas vías. El número de ensayos homogéneos en "pithed-rat" fue siempre 5-6 y en aorta de conejo 7-9.

A continuación se describen las preparaciones de "pithed-rat" y de anillos de aorta de conejo, así como los ensayos que tienen lugar en ambos tipos de preparaciones. En las págs. 87 y 88 presentamos además un cuadro resumen de los ensayos realizados.

2.2.- PREPARACION DE "PITHED-RAT"

Hemos utilizado ratas Sprague-Dawley, de ambos sexos, y con un peso entre 240-260 g. La preparación de "pithed rat" se montó según la técnica descrita por Shipley y Tilden (1947) y más recientemente por Gillespie (1967,1970), modificándose la técnica original en algunos casos por requerirlo así este estudio. A continuación se detalla el procedimiento seguido :

Introducimos la rata en una campana de cristal, en la que previamente hemos puesto para su anestesia un algodón impregnado de éter etílico. Después de 5 a 7 minutos la rata queda anestesiada, y la situamos entonces en una cama para ensayos de animal "in vivo" en posición decúbito supino. Efectuamos una incisión en la zona ventromedial del cuello, y procedemos a separar y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal de aproximadamente 4 cm. de largo y 2.5 cm. en su zona más ancha. A través del ojal se separan los músculos paratraqueales hasta dejar al descubierto la tráquea. Pasamos dos hilos por debajo de ésta, y realizamos una incisión entre dos anillos traqueales introduciendo a su través una cánula que queda anudada con los hilos (uno en posición proximal y otro en posición distal). A continuación, y para evitar que el animal siga absorbiendo más anestésico, procedemos a descerebrarlo y desmedularlo con un vástago metálico de 18 cm. de largo y 1.5 mm. de diámetro, que introducimos por la órbita del ojo derecho, pasándolo por el "foramen magnum", para alcanzar el bulbo raquídeo y seguir por el canal medular hasta el sacro completando así la desmedulación. Inmediatamente conectamos la cánula traqueal a un aparato de respiración asistida (Scientific & Research Instruments Ltd. " ventilador para animales pequeños "). Administramos un volumen de aire de 2 c.c. por cada 100 g. de peso del animal, con una frecuencia de 50 emboladas por minuto. Después de instaurar la respiración asistida, disecamos el paquete vásculo-nervioso del lado derecho formado por la arteria carótida primitiva y el nervio vago, separamos y cortamos dicho nervio dejando libre la arteria, y pasamos por debajo de ésta dos hilos, ligando el correspondiente a la parte distal y dejando iniciado un nudo en el correspondiente a la parte proximal para la posterior ligadura de una cánula. Una vez que tenemos preparada de esta manera la arteria carótida, colocamos una pinza de arteria entre ambos hilos, cercana al nudo proximal que habíamos iniciado. La pinza tiene como

misión Interrumpir la circulación para permitirnos realizar con una fina tijera un pequeño corte arterial(de aproximadamente la mitad del calibre de la arteria). Introducimos a través de la incisión una cánula de plástico, previamente conectada a un manómetro de mercurio por un sistema cerrado lleno de suero fisiológico. La cánula debe ser firmemente fijada por los hilos que teníamos preprados. Damos una presión inicial al sistema de mercurio de 70 mm. Hg., e inyectamos en la cánula 150 U./kg. de heparina sódica en un volumen de suero fisiológico de 0,2 c.c. con el fin de evitar la posterior coagulación sanguínea durante el ensayo. En este momento se procede a retirar la pinza arterial y el sistema queda conectado permitiendonos medir la PSD. Dado que la tensión arterial en "pithed-rat" (es decir después de tener a la rata descerebrada y desmedulada), oscila alrededor de los 40 mm. Hg., se produce inicialmente un transvase de suero fisiológico y heparina hacia el interior del animal hasta que se equilibran las presiones, quedando por tanto heparinizada la rata. Contralateralmente disecamos la yugular izquierda, ligándola con un hilo en su parte distal, y dejando incluido un nudo con otro hilo en la parte proximal. Realizamos un corte con una fina tijera (de aproximadamente la mitad del calibre de la vena), para posteriormente introducir una cánula. Procedemos a dilatar la vena (que generalmente se encuentra colapsada debido a las manipulaciones), mediante tracciones con unas pinzas finas, o bien con un algodón impregnado en suero fisiológico caliente, y una vez que se ensancha la vena introducimos la cánula dejándola firmemente anudada con los hilos que habíamos colocado. Esta cánula está conectada a un goteo de suero fisiológico cerrado. Esto nos permitirá administrar en bolo todos los fármacos por vía intravenosa (iv.). Para ello introducimos un volumen de 0,4 ml./kg., es decir que las disoluciones se calcularon para ser inyectadas en un volumen total de 0,1 ml./dosis. Así pues, una vez que inyectamos en la cánula de la yugular izquierda un fármaco, procedemos a lavar el sistema con el goteo de suero fisiológico dejando pasar un volumen de 0,1 ml. para el arrastre de esa dosis. Para un grupo de ensayos, la rata estaba ya preparada, pero en los casos en que debíamos usar algún AgCa o AnCa, usualmente se prefirió administrar estos cerca del cayado de la aorta evitando así la cardiotoxicidad aguda. Para ello, procedimos a disecar la arteria carótida primitiva izquierda, según la misma técnica descrita para la derecha. Esta nueva disección se muestra más dificultosa debido a la estrechez del campo

quirúrgico después de las anteriores maniobras. Como inconveniente añadido para alcanzar el cayado de la aorta tenemos necesidad de introducir a lo largo de esta arteria un fino catéter que permitirá inyectar fármacos directamente en el circuito sistémico. Así pues, una vez que tenemos la arteria carótida primitiva izquierda diseccionada, procedemos a pasar dos hilos por debajo, anudando el hilo distal y dejando iniciado el nudo del hilo proximal. Colocamos de nuevo la pinza arterial cercana al hilo proximal y damos un fino corte en la arteria (aproximadamente la tercera parte del calibre de la arteria). Introducimos el catéter hasta que choca con la pinza arterial, y lo anudamos ligeramente con el hilo cuyo nudo estaba iniciado para evitar que refluya sangre al soltar la pinza. El nudo no debe oprimir el catéter totalmente, y debe permitir que este se desliza por el interior de la arteria hasta el cayado de la aorta. En este momento, soltamos la pinza arterial y empujamos simultáneamente el fino catéter hasta que se introduce aproximadamente 3 cm. de largo (longitud calculada para alcanzar el cayado de la aorta), procediendo entonces a su anudamiento definitivo. El catéter introducido hasta el cayado de la aorta, servirá para la infusión intrarterial (ia.) de las DHP antes de iniciar la administración en bolo de otros fármacos por la yugular. Así pues, la administración de los AgCa y AnCa se hace mediante perfusión continua con una bomba de infusión Scientific & Research Instruments Ltd., perfundiendo un volumen total de 0.5 ml. en 2 minutos (1 ml./kg./minuto). Los cambios en la presión sanguínea diastólica se registraron en un kimógrafo B. Braun Melsungen. La temperatura de la rata durante todo el ensayo se mantiene constante a 37°C por medio de calor radiante.

2.3.- PREPARACION DE ANILLOS DE AORTA DE CONEJO

Diversos investigadores han empleado la preparación de anillos de aorta de conejo para estudios "in vitro". En 1972 la describió Van Bremen (Van Bremen y col. 1972), y su montaje es muy similar en posteriores trabajos de este y otros grupos. A continuación describimos detalladamente el procedimiento utilizado por nosotros.

Se sacrificaron conejos New Zealand de ambos sexos, y peso 2-3 kg., mediante un golpe en la nuca, seguido de un corte en la yugular. Se extrajo una porción de aorta torácica de unos 5-6 cm. abriendo el torax y seleccionando el segmento central de arteria comprendido entre el arco aórtico y el diafragma. La porción extraída se lavó en un vaso de precipitados, disecándose y limpiándose a continuación de tejido adiposo y conectivo en una placa Petri que contenía al igual que el vaso de precipitados solución Krebs Henseleit (1932) con la siguiente composición (mM): ClNa 118.2; ClK 4.7; Cl₂Ca 2.5; PO₄H₂K 1.2; SO₄Mg 1.2; CO₃HNa 25; glucosa 10. La porción de aorta se cortó en anillos de 3-4 mm de anchura, despreciando 6-8 mm en los extremos por estar estos sometidos usualmente a mayor manipulación en el proceso de disección y limpieza. Los anillos se montaron en baños de órganos de 40 ml. que contenían también como líquido nutritivo solución Krebs Henseleit a 37°C oxigenado con gas carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Las preparaciones se introducen por un gancho de hilo de acero inoxidable de 1 mm. de diámetro que tiene forma de U invertida y que atraviesa el lumen de los anillos, quedando éstos situados en su zona central. Este gancho está unido a un soporte que mantiene fijas las preparaciones en el baño. Se introduce por el otro extremo de la preparación otro dispositivo similar con forma de anzuelo para poder aplicar tensión en el anillo. El gancho superior se conecta a un transductor isométrico Panlab modelo UF-1, aplicando a las preparaciones una tensión inicial de aproximadamente 5 g. La fuerza de las contracciones se midió y registró por medio de un polígrafo Panlab OmniScribe modelo D 5217-5. Antes de comenzar los ensayos farmacológicos las preparaciones se mantuvieron en el baño de órganos durante 90 minutos para su relajación y estabilización. Se lavaron con líquido nutritivo cada 15 minutos, ajustando frecuentemente la tensión durante este periodo para mantener al final una tensión

de reposo de 2 g. A continuación comenzamos los distintos tipos de ensayos previstos en esta preparación en la presente Tesis Doctoral.

2.4.- ENSAYOS EN "PITHED-RAT"

En la preparación de "pithed-rat" hemos llevado a cabo tres grupos de ensayos:

- A) Ensayos para estudiar el efecto de nifedipina y BAY K 8644 administrados iv. e ia.
- B) Ensayos con Ag α_1 selectivos.
- C) Ensayos con Ag α_2 selectivos.

A continuación explicamos detalladamente estos ensayos y en la página 87 figura un cuadro resumen de los mismos.

A) Ensayos para estudiar el efecto de nifedipina y BAY K 8644 administrados iv. e ia.:

Se estudió la modificación de la PSD producida por la administración sucesiva de dosis crecientes (10-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}.$) de nifedipina en bolo por la yugular izquierda. El efecto producido en estos ensayos se comparó con el obtenido cuando la nifedipina se administraba en infusión (100 $\mu\text{g}/\text{kg}.$, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}.$) en la carótida izquierda según el método descrito en el apartado 2.2.

Igualmente se estudió la modificación de la PSD producida por administración sucesiva de dosis crecientes (10-300 $\mu\text{g}/\text{kg}.$) de BAY K 8644 en bolo por la yugular izquierda. El efecto producido en estos ensayos se comparó con el obtenido cuando el BAY K 8644 se administraba en infusión (100 $\mu\text{g}/\text{kg}.$ y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}.$) en la carótida izquierda según el método descrito en el apartado 2.2.

B) Ensayos con Ag α_1 selectivos :

Los Ag α_1 se administraron en condiciones control, y después de tratamiento con nifedipina, BAY K 8644 o TMB-B.

Como Ag α_1 selectivos hemos utilizado metoxamina y fenilefrina. Para los experimentos control los Ag α_1 se inyectaron iv. en la yugular izquierda en un volumen de 0.4 ml./kg., midiéndose a continuación el incremento en la PSD producido. Se llevó a cabo en cada animal una curva dosis-respuesta. El rango de dosis

utilizado para las curvas de metoxamina fue 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$., y para las de fenilefrina fue 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cuando se administraban dosis bajas de estos agonistas se esperaba conseguir la recuperación de la PSD hasta el nivel basal antes de administrar la siguiente dosis. Después de las dosis más elevadas en ocasiones no se recuperaba el nivel basal por lo que se administraba la dosis siguiente después de transcurrido un tiempo razonable en el que se estabilizaba la PSD.

Los ensayos control se compararon con experimentos similares en los que la administración de los $\text{Ag } \alpha_1$ comenzaba 15 minutos después de tratamiento con distintas dosis de nifedipina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$., 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. ó 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.) o con distintas dosis de BAY K 8644 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. ó 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$.). La nifedipina y el BAY K 8644, para evitar la cardiotoxicidad aguda, se infundieron para estos tratamientos durante dos minutos por vía i.v., según el método descrito en el apartado 2.2.

Los ensayos control también se compararon con ensayos similares en los que la administración de los $\text{Ag } \alpha_1$ comenzaba 15 minutos después de un tratamiento con TMB-8 (3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.). El TMB-8 se administró i.v. en bolo por la yugular izquierda. Se llevaron a cabo ensayos en los que 15 minutos después de administrar 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. de TMB-8 por la yugular izquierda se realizaba una infusión i.v. de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. de nifedipina, comenzando a su vez la administración de los $\text{Ag } \alpha_1$ 15 minutos después de finalizar la infusión. Estos ensayos se compararon con los ensayos control, y también se compararon con los ensayos en los que los $\text{Ag } \alpha_1$ se habían administrado después de tratamiento únicamente con 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. de nifedipina.

C) Ensayos con $\text{Ag } \alpha_2$ selectivos :

Los $\text{Ag } \alpha_2$ se administraron en condiciones control, y después de tratamiento con nifedipina o BAY K 8644.

Como $\text{Ag } \alpha_2$ selectivos hemos utilizado B-HT 920 y B-HT 933. Para los experimentos control los $\text{Ag } \alpha_2$ se inyectaron i.v. por la yugular izquierda en un volumen de 0.4 ml./kg., midiéndose a continuación el incremento de la PSD producido. Se llevó a cabo en cada animal una curva dosis respuesta. El rango de dosis utilizado para las curvas de B-HT 920 fue 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. y para las de B-HT 933 fue 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.-3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.. Las dosis de los $\text{Ag } \alpha_2$ se administraban en forma acumulativa, con un margen de tiempo razonable entre dos dosis ya que

después de obtenerse las respuestas presoras con éstos fármacos, no se conseguía en general volver a los niveles basales de presión basal.

2.5.- ENSAYOS EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO

En las preparaciones de anillos de aorta de conejo se han llevado a cabo tres grupos de ensayos:

- A) Ensayos con CIK.
- B) Ensayos con Ag α_1 selectivos.
- C) Ensayos con Ag α_2 selectivos.

A continuación explicamos detalladamente estos ensayos y en la página 88 figura un cuadro resumen de los mismos.

A) Ensayos con CIK.

En estos ensayos se estudia el efecto de BAY K 8644, nifedipina y TMB-8, sobre las despolarizaciones producidas por CIK.

Se estudió la despolarización de los anillos de aorta de conejo con dosis acumulativas de CIK que se administraban en las distintas preparaciones, alcanzándose sucesivamente las concentraciones 15 mM, 30 mM, 60 mM, y 80 mM. La altura máxima de la contracción producida al alcanzar la concentración 80 mM se considera el 100%, valorándose a continuación el porcentaje de altura contráctil alcanzada con las anteriores concentraciones. Este tipo de ensayos también se llevaron a cabo después de incubar los anillos durante 15 minutos con BAY K 8644 (10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M). En este caso también se utilizó la altura alcanzada con el CIK 80 mM como valor 100%, pues pudo comprobarse con los estudios que a continuación se describen que el efecto de CIK 80 mM supone la despolarización máxima por CIK, y no se modifica por BAY K 8644.

Se estudió la modificación del efecto de CIK 80 mM en presencia de BAY K 8644, nifedipina y TMB-8. En primer lugar se evaluó el momento en que las preparaciones presentan respuestas estables al CIK 80 mM. Para ello en un lote de ensayos se administró CIK 80 mM siete veces consecutivas en la misma preparación; lavando con líquido nutritivo para conseguir su relajación hasta el nivel de tono basal 10 minutos después de cada administración (momento en el que se

estima que la contracción por CIK 80 mM ha alcanzado su altura máxima). Para estudiar la modificación del efecto de CIK 80 mM por los distintos fármacos se utilizó la altura máxima alcanzada por la tercera administración de CIK 80 mM en cada preparación como altura control con valor del 100%, pues hasta este momento parece existir un ligero potenciamiento de las respuestas sucesivas a CIK 80 mM. En un lote de ensayos se efectuaron las siete administraciones de CIK 80 mM según la pauta establecida, pero llevando a cabo las administraciones cuarta, quinta, sexta y séptima, después de incubar las preparaciones 15 minutos con nifedipina $10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $10^{-7}M$ y $10^{-8}M$ respectivamente. En otro lote se llevaron a cabo únicamente cuatro administraciones de CIK 80 mM, teniendo lugar la cuarta después de un periodo de 15 minutos de incubación con BAY K 8644 $10^{-6}M$. Para evaluar el efecto de TMB-8 utilizamos también la tercera administración de CIK 80 mM como control. Después de esta administración control se llevaban a cabo administraciones sucesivas de CIK 80 mM que tenían lugar después de incubar 30 minutos con distintas concentraciones crecientes de TMB-8 comprendidas en el rango de $10^{-6}M$ - $10^{-8}M$. En estos ensayos después de cada administración de CIK 80 mM también se lavaban las preparaciones para su relajación hasta el nivel de tono basal. En algunos de estos ensayos después de administrar el CIK 80 mM en presencia de TMB-8 $10^{-6}M$, se volvió nuevamente a recuperar el tono basal por lavado de las preparaciones con líquido nutritivo, y se hizo otra administración de CIK 80 mM, pero esta vez después de incubar las preparaciones durante 30 minutos con BAY K 8644 $10^{-6}M$ además de TMB-8 $10^{-6}M$.

B) Ensayos con $Ag \alpha_1$ selectivos :

Como $Ag \alpha_1$ selectivos hemos utilizado metoxamina y fenilefrina. Estos compuestos se administraban en forma acumulativa en el baño de órganos para obtener curvas dosis—respuesta en distintas condiciones. Después de establecer las curvas dosis—respuesta control, hemos estudiado el efecto de los $Ag \alpha_1$ en presencia de BAY K 8644 $10^{-6}M$, de nifedipina $10^{-6}M$, de TMB-8 ($10^{-6}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-6}M$), y también en presencia de TMB-8 $10^{-6}M$ junto a nifedipina $10^{-6}M$. También hemos estudiado el efecto de los $Ag \alpha_1$ en líquido nutritivo sin calcio y con EGTA 0.5 mM, así como en líquido hiperpotásico (CIK 15 mM), y en líquido hiperpotásico en

presencia de nifedipina 10^{-6} M.

Para los ensayos control se evaluó el efecto de dosis acumulativas crecientes de metoxamina y fenilefrina en distintas preparaciones, utilizando como valor de contracción 100% la altura máxima alcanzada por la administración previa de CIK 80 mM. Es decir, que después del período de estabilización de las preparaciones, estas se someten a una despolarización con CIK 80 mM, estableciéndose esta como respuesta contráctil 100%, para posteriormente valorar en función de ella las respuestas de los $Ag\alpha_1$. Se comenzó la administración de los $Ag\alpha_1$ después de conseguir la relajación de las preparaciones por lavado con líquido nutritivo hasta el nivel de tono basal previo a la administración de CIK 80 mM. El rango de dosis ensayada fue para metoxamina 10^{-6} M - 10^{-4} M, y para fenilefrina 10^{-7} M - 10^{-4} M. Estos ensayos control se compararon con ensayos similares en los que la administración de los $Ag\alpha_1$ tenía lugar después de incubar las preparaciones 15 minutos con BAY K 8644 10^{-6} M, o con nifedipina 10^{-6} M; o bien después de incubarlas durante 30 minutos con distintas concentraciones de TMB-8 (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M). En un lote de ensayos en los que se incubaban 30 minutos con TMB-8 10^{-6} M los 15 últimos minutos las preparaciones también permanecieron incubadas con nifedipina 10^{-6} M.

También hemos estudiado el efecto de los $Ag\alpha_1$ en líquido nutritivo sin calcio y con EGTA 0.5 mM. Para estos ensayos después de provocar la despolarización con CIK 80 mM, se procedió a lavar la preparación con solución nutritiva sin calcio y con EGTA 0.5 mM. Se hicieron lavados sucesivos con el líquido nutritivo sin calcio cada 15 minutos durante 45 minutos, al cabo de los cuales se procedió a administrar los $Ag\alpha_1$ en forma acumulativa según la pauta establecida para las curvas dosis-respuesta.

En otras preparaciones se valoró el efecto de los agonistas α_1 en líquido hiperpotásico (CIK 15 mM), estableciendo siempre en cada preparación como valor de contracción 100% la altura máxima alcanzada por la administración previa de CIK 80 mM. Estos ensayos se compararon con otros similares en líquido hiperpotásico en los que la administración de los agonistas α_1 tenía lugar después de incubar las preparaciones 15 minutos con nifedipina 10^{-6} M.

C) Ensayos con Ag α_2 selectivos :

Como Ag α_2 selectivos hemos utilizado B-HT 920 y B-HT 933. En estos ensayos también después del período de estabilización de las preparaciones se provocaba una despolarización con ClK 80 mM, y la altura máxima alcanzada se utilizaba como respuesta contráctil 100%, para posteriormente valorar en función de ella las respuestas de los Ag α_2 . Diez minutos después de la administración de ClK 80 mM se recuperó el tono basal lavando las preparaciones con líquido nutritivo, y se procedió a administrar los Ag α_2 en forma acumulativa, utilizando concentraciones en el rango 10^6 M - 10^4 M, para obtener las curvas dosis-respuesta de ambos fármacos. Estos ensayos control se compararon con otros similares en los que se estudiaba el efecto de los Ag α_2 en presencia de BAY K 8644 o en presencia de BAY K 8644 y el antagonista α_2 yohimbina. Por tanto, el B-HT 920 y el B-HT 933 se administraban después de incubar las preparaciones 15 minutos con BAY K 8644 10^6 M o bien después de incubarias con BAY K 8644 10^6 M y yohimbina 10^6 M. Se hicieron también ensayos con B-HT 920 y B-HT 933 en presencia del antagonista α_2 prazosín, incubando en este caso las preparaciones durante 15 minutos con prazosín 10^6 M antes de administrar B-HT 920 o B-HT 933. Por último, en otros ensayos las preparaciones se incubaban 15 minutos con BAY K 8644 10^6 M y prazosín 10^6 M antes de administrar los Ag α_2 . Además, se hicieron ensayos con B-HT 920 en los que las preparaciones se incubaban 15 minutos con BAY K 8644 10^6 M, prazosín 10^6 M y yohimbina 10^6 M.

CUADRO RESUMEN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN "PITHED-RAT"

ENSAYOS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE NIFEDIPINA Y BAY K 8644
ADMINISTRADOS IV. e IA. .-

- * Nifedipina iv.
- * Nifedipina ia.
- * BAY K 8644 iv.
- * BAY K 8644 ia.

ENSAYOS CON Ag α_1 SELECTIVOS .-

- * Controles de Ag α_1
- * Ag α_1 después de tratamiento con nifedipina
- * Ag α_1 después de tratamiento con BAY K 8644
- * Ag α_1 después de tratamiento con TMB-8
- * Ag α_1 después de tratamiento con TMB-8 y nifedipina

ENSAYOS CON Ag α_2 SELECTIVOS.-

- * Controles de Ag α_2
- * Ag α_2 después de tratamiento con nifedipina
- * Ag α_2 después de tratamiento con BAY K 8644

CUADRO RESUMEN DE LOS ENSAYOS EN AORTA DE CONEJO

ENSAYOS CON CIK .-

- * Distintas concentraciones de CIK
- * Distintas concentraciones de CIK en presencia de BAY K 8644
- * CIK 80 mM en presencia de nifedipina
- * CIK 80 mM en presencia de TMB-8 y en presencia de TMB-8 y BAY K 8644

ENSAYOS CON Ag α_1 , SELECTIVOS .-

- * Controles con Ag α_1
- * Ag α_1 en presencia de nifedipina
- * Ag α_1 en presencia de BAY K 8644
- * Ag α_1 en presencia de TMB-8
- * Ag α_1 en presencia de TMB-8 y nifedipina.
- * Ag α_1 en líquido nutritivo sin calcio y con EGTA
- * Ag α_1 en líquido hiperpotásico
- * Ag α_1 en líquido hiperpotásico en presencia de nifedipina

ENSAYOS CON Ag α_2 , SELECTIVOS .-

- * Controles con Ag α_2
- * Ag α_2 en presencia de BAY K 8644
- * Ag α_2 en presencia de BAY K 8644 y yohimbina
- * Ag α_2 en presencia de prazosín
- * Ag α_2 en presencia de prazosín y BAY K 8644
- * B-HT 920 en presencia de prazosín, BAY K 8644 y yohimbina

2.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados fueron tratados estadísticamente de la siguiente forma :

- * Se agruparon los datos experimentales según los distintos ensayos realizados.
- * Los datos de un grupo homogéneo de ensayos se trataron con un programa de ordenador construido para esta Tesis Doctoral. Dicho programa calcula :

- La media aritmética (\bar{x}), sumando todos los datos obtenidos experimentalmente y dividiendo por el número de ensayos :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

- La desviación típica (σ), como medida de la dispersión real de los valores de la muestra, con lo que obtenemos un índice descriptivo de la concentración de nuestros datos:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

- El error standard de la media (E.S.M.), como medida de la dispersión imaginaria que tendríamos ante varias repeticiones hipotéticas del experimento :

$$\text{E.S.M.} = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

El término del denominador "n-1" son los grados de libertad. En nuestro caso, consideramos que la media de la muestra que tenemos nos va a definir el centro del intervalo de confianza pasando de esta manera a ser una media poblacional, por lo que en realidad estamos obligando a nuestra media que no es libre y resta de esta forma un grado de libertad.

* Una vez obtenidos los parámetros indicados, se construyó otro programa de ordenador, ya que al ser en todos nuestros ensayos la muestra inferior a 30 individuos, y por tanto no seguir las características de una curva de Gauss, resultaba

necesario introducir un coeficiente corrector progresivo o "t de Student" que permitiese contrastar los distintos datos de \bar{x}, σ , E.S.M., y nos diese la probabilidad de error con el 95% de intervalo de confianza ($p < 0.05$), con el 99% de intervalo de confianza ($p < 0.01$) y con el 99.9% de intervalo de confianza ($p < 0.001$). Consideramos significativa la diferencia para valores a partir de $p < 0.05$. Es decir, que la significación estadística de los distintos grupos se evaluó utilizando la prueba de "Student" para comparación de medias en poblaciones no emparejadas.

* Para comparar los resultados obtenidos en "pithed-rat" con $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$ después de distintos tratamientos, hemos utilizado el parámetro de la Dosis Efectiva 50 (DE_{50}), teniendo en cuenta que en estos ensayos la DE_{50} se define como la dosis que produce un incremento de la PSD de 50 mm.Hg. Del mismo modo para comparar los resultados obtenidos en anillos de aorta de conejo con $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$ en presencia de distintos fármacos, y en las distintas condiciones experimentales, hemos utilizado el parámetro de la DE_{50} , que en este caso queda definido como la dosis que produce un efecto contráctil igual al 50% del efecto contráctil máximo de este agonista en condiciones control. Mediante otro programa de ordenador construido para esta Tesis Doctoral, se obtenían las DE_{50} de cada ensayo, estableciendo a continuación el valor medio de la relación entre la DE_{50} después de cada tratamiento (en cada situación experimental ensayada), y la DE_{50} control.

* Hemos hallado también el área bajo la curva para las distintas curvas dosis-respuesta de $Ag \alpha_1$, $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat", y en anillos de aorta de conejo, expresando este área en cada caso como porcentaje del área bajo la curva control, y considerando esta 100%. El área bajo la curva se obtuvo con el programa de ordenador Sigma.

3.- RESULTADOS

3.1.- RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN "PITHED-RAT".

Recordemos que en la preparación de "pithed-rat" hemos llevado a cabo tres grupos de ensayos:

- A) Ensayos para estudiar el efecto de nifedipina y BAY K 8644 administrados iv. e ia.
- B) Ensayos con Ag α_1 selectivos.
- C) Ensayos con Ag α_2 selectivos.

A continuación expondremos los resultados correspondientes a estos tres grupos de ensayos.

- A) Ensayos para estudiar el efecto de nifedipina y BAY K 8644 administrados iv. e ia.:

La administración de nifedipina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en la yugular produjo en general descensos presores poco significativos, que resultaban algo más acusados cuando la PSD basal del animal era más alta (Tabla 9 pág. 93 y Figura 18 pág. 95). Ocasionalmente después de la administración de las dosis más elevadas se produjo la muerte del animal. Estas mismas concentraciones administradas en el cayado de la aorta mediante infusión ia., no provocaron nunca la muerte del animal; y ocasionaron disminución de la PSD sólo en animales con PSD inicial mayor de 40 mm Hg. La disminución de la PSD estaba de nuevo condicionada por el nivel inicial, de forma que independientemente de cual fuese éste, con la administración de nifedipina se estabilizaba siempre la PSD en valores próximos a los 30 mm Hg. Por otra parte, no se pudo apreciar diferencia en el efecto con 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina o con 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina, si la administración era ia. (Tabla 10 pág. 94 y Figura 18 pág. 95).

TABLA 9

PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE DISTINTAS DOSIS DE NIFEDIPINA EN LA YUGULAR.

Ensayo	PSD Inicial	PSD DESPUES DE NIFEDIPINA $\mu\text{g}/\text{kg}$					Δ PSD
		10	30	100	300	1000	
1	55	50	48	45	40	40	-15
2	44	43	42	37	34	31	-13
3	43	43	43	43	43	43	0
4	38	38	38	38	38	35	-3
5	36	34	33	33	33	32	-4
6	32	31	30	30	30	29	-3

Los datos representan los valores en distintos ensayos para poder apreciar la relación entre el valor inicial y su modificación por las distintas dosis de nifedipina. El incremento presor corresponde al incremento final después de la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina.

TABLA 10

PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" DESPUES DE LA PERFUSION DE NIFEDIPINA EN EL CAYADO DE LA AORTA.

Ensayo	NIFEDIPINA 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$			NIFEDIPINA 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	PSD Inicial	PSD Final	Δ PSD	PSD Inicial	PSD Final	Δ PSD
1	35	30	-5	40	33	-7
2	43	28	-15	34	28	-6
3	45	30	-15	30	24	-6
4	50	32	-18	55	35	-20
5	40	28	-12	33	27	-6
6	40	30	-10	38	29	-9

Los datos representan los valores en distintos ensayos para poder apreciar la relación entre el valor inicial y el incremento presor.

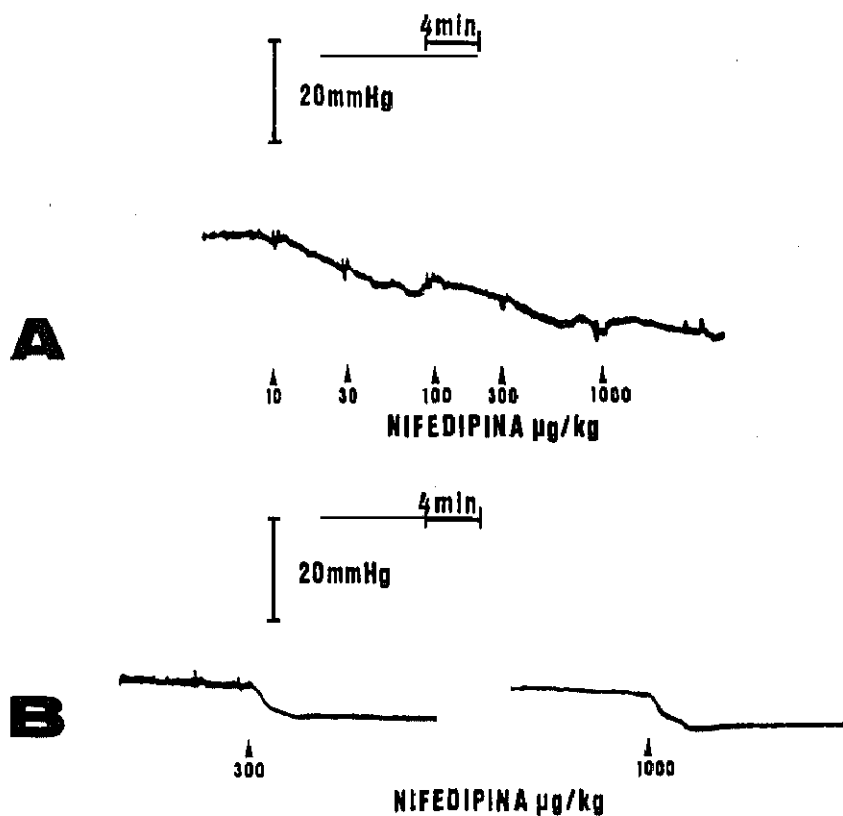


FIGURA 18.- Registros de la modificación de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por administración de nifedipina en la yugular (A) y en el cayado de la aorta (B).

La administración de BAY K 8644 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en la yugular produjo un incremento presor dosis dependiente (Tabla 11 pág. 97 y Figura 19 pág. 98). Después de la elevación de la PSD esta descendía nuevamente, pero no se conseguía recuperar el nivel basal inicial ni siquiera al utilizar las concentraciones más bajas. La infusión de BAY K 8644 en el cayado de la aorta produjo también una elevación de la PSD, pero en este caso sólo se apreciaba elevación con concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La elevación de la PSD resultó siempre menor si se administraba el BAY K 8644 en el cayado de la aorta que si se administraba en la yugular, y con las administraciones la PSD recuperó el nivel basal inicial poco después de finalizar la infusión (Figura 19 pág. 98). Las concentraciones de BAY K 8644 infundidas usualmente por vía ia., han sido 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (utilizadas para ensayos con $\text{Ag } \alpha_1$ y $\text{Ag } \alpha_2$), habiéndose conseguido con ellas elevaciones de la PSD de $32.7 \pm 2.8 \text{ mm Hg}$ ($n = 22$) y $41.7 \pm 2.2 \text{ mm Hg}$ ($n = 23$) respectivamente, independientemente de la vía utilizada. No se han observado con BAY K 8644 incrementos mayores de la PSD cuando los ensayos comenzaban con PSD baja.

TABLA 11

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT"
DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE DISTINTAS DOSIS DE BAY K 8644 EN LA
YUGULAR.

BAY K 8644 $\mu\text{g/kg}$	PSD $\bar{x} \pm \text{ESM}$
0.1	4.4 \pm 0.5
0.3	5.2 \pm 1.2
1	5.4 \pm 1.0
3	10.0 \pm 2.0
10	19.8 \pm 4.0
30	28.4 \pm 6.0
100	34.6 \pm 5.9
300	37.0 \pm 4.2

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5 ensayos.

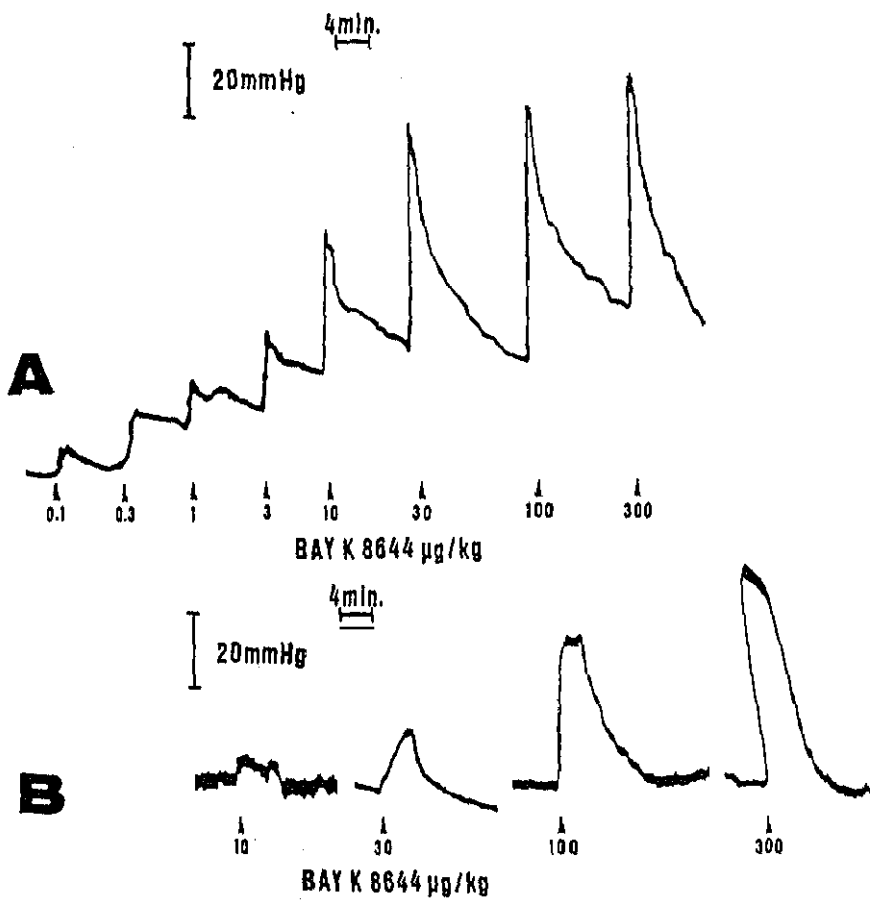


FIGURA 19.- Registros de la modificación de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por administración de BAY K 8644 en la yugular (A) y en en el cayado de la aorta (B).

B) Ensayos con Ag α , selectivos:

Los Ag α , (metoxamina y fenilefrina) produjeron un incremento dosis-dependiente de la PSD en "pithed-rat". Este incremento de la PSD se produjo de forma rápida, recuperándose poco tiempo después el nivel basal. En ocasiones después de la administración de las dosis más altas, el nivel basal no se consiguió recuperar. El incremento de la PSD producido por los Ag α , fue menor cuando estos fármacos se administraban después de tratamiento con nifedipina la., existiendo ya diferencia estadística con los controles cuando se utilizaba la concentración 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la infusión de nifedipina. Las curvas dosis-respuesta de los Ag α , se desplazaron a la derecha, existiendo un desplazamiento más acusado con mayor concentración de nifedipina en la infusión (Tablas 12 y 13 págs. 100 y 102, Figuras 20 y 21 págs. 101 y 103).



TABLA 12

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR METOXAMINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE NIFEDIPINA.

METOXAMINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA $\mu\text{g/kg}$		
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	1000 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
1	2.7 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	1.0 \pm 0.0**	1.4 \pm 0.2
3	5.3 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3***	2.6 \pm 0.3***	2.0 \pm 0.0***
10	9.7 \pm 0.8	3.6 \pm 0.4***	3.8 \pm 0.4***	3.0 \pm 0.3***
30	16.3 \pm 1.8	8.4 \pm 1.4**	8.4 \pm 0.8**	6.0 \pm 1.5***
100	56.2 \pm 5.6	32.0 \pm 4.2**	32.0 \pm 4.2**	22.6 \pm 4.8**
300	108.3 \pm 4.3	76.4 \pm 6.7**	75.6 \pm 8.9**	54.0 \pm 7.3***
1000	127.7 \pm 4.7	128.4 \pm 6.8	112.0 \pm 5.9	98.2 \pm 7.3**

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

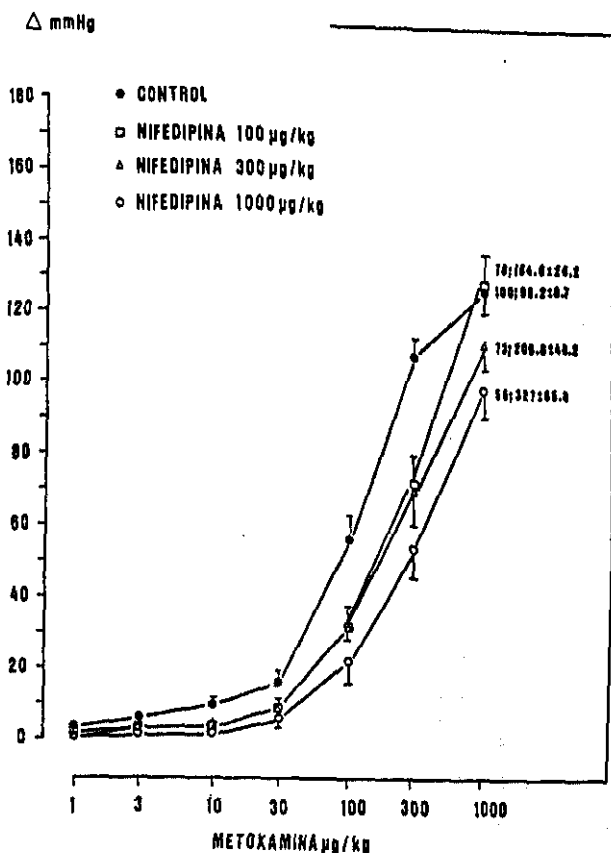


FIGURA 20.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por metoxamina iv. en "pithed-rat". Control (●), después del tratamiento ia. con distintas dosis de nifedipina: 100 μg/kg (□), 300 μg/kg (Δ), y 1000 μg/kg (○). Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (μg/kg).

TABLA 13

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR FENILEFRINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE NIFEDIPINA.

FENILEFRINA µg/kg	CONTROL x̄ ± ESM	NIFEDIPINA µg/kg		
		100 x̄ ± ESM	300 x̄ ± ESM	1000 x̄ ± ESM
0.1	5.8 ± 0.8	2.2 ± 0.5**	2.6 ± 0.3**	1.4 ± 0.3***
0.3	11.4 ± 1.4	5.0 ± 0.6**	3.5 ± 0.2**	3.4 ± 0.4***
1	16.0 ± 2.9	7.0 ± 1.0*	4.6 ± 0.3**	4.4 ± 0.4**
3	29.0 ± 5.5	12.4 ± 1.8*	9.2 ± 0.7**	8.0 ± 0.6**
10	50.2 ± 9.5	27.8 ± 3.7	17.8 ± 0.8**	15.8 ± 1.6**
30	77.4 ± 10.2	51.2 ± 6.8	34.2 ± 1.8**	35.8 ± 2.9**
100	113.2 ± 7.3	95.6 ± 6.3	68.8 ± 3.4***	69.6 ± 4.6***
300	152.0 ± 1.5	129.0 ± 2.0***	115.2 ± 5.4***	107.0 ± 7.6***

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

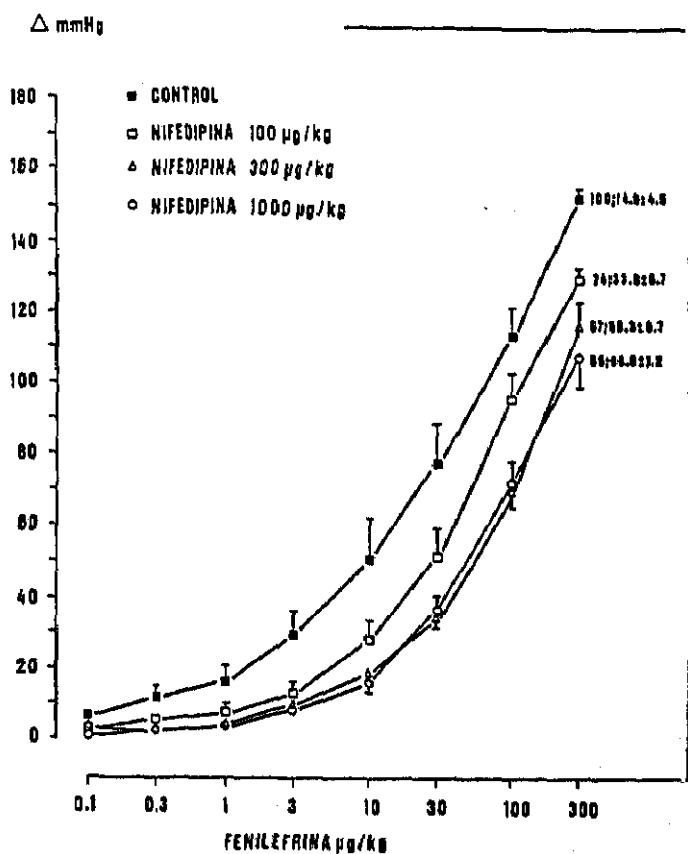


FIGURA 21.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por fenilefrina iv. en "pithed-rat". Control (■), después del tratamiento ia, con distintas dosis de nifedipina: 100 µg/kg (□), 300 µg/kg (△), y 1000 µg/kg (○). Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (µg/kg).

El incremento de la PSD producido por los Ag α_1 , fue mayor cuando estos fármacos se administraban después de tratamiento Ia. Con BAY K 8644 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la diferencia con el valor control no fue usualmente significativa para la mayoría de las dosis de los Ag α_1 . Con BAY K 8644 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la diferencia con el valor control no fue significativa para la mayoría de las dosis de metoxamina, pero fue significativa para algunas de las dosis de fenilefrina. Las curvas dosis-respuestas de los Ag α_1 , se desplazaron en este caso a la izquierda, existiendo un desplazamiento algo más acusado con la mayor concentración de BAY K 8644. (Tablas 14 y 15 págs. 105 y 107, Figuras 22 y 23 págs. 106 y 108).

TABLA 14

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR METOXAMINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE BAY K 8644.

METOXAMINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 $\mu\text{g/kg}$	
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
1	2.7 \pm 0.3	4.8 \pm 0.4**	6.4 \pm 1.1**
3	5.3 \pm 0.4	6.4 \pm 0.5	7.8 \pm 1.2
10	9.7 \pm 0.8	11.2 \pm 0.4	12.8 \pm 1.7
30	16.3 \pm 1.6	22.0 \pm 1.2*	27.0 \pm 2.9*
100	56.2 \pm 5.6	57.0 \pm 4.1	71.6 \pm 5.5
300	106.3 \pm 4.3	106.2 \pm 5.5	121.6 \pm 3.9
1000	127.7 \pm 4.7	129.2 \pm 4.4	138.4 \pm 3.6

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

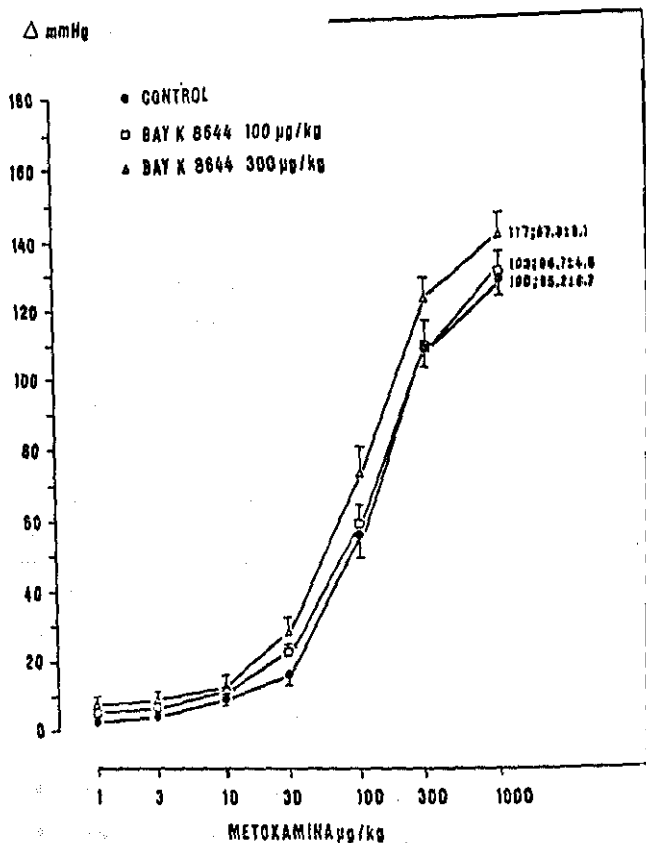


FIGURA 22.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por metoxamina iv. en "pithed-rat". Control (●), después del tratamiento la. con distintas dosis de BAY K 8644: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (□), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Δ). Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

TABLA 15

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR FENILEFRINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE BAY K 8644.

FENILEFRINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 $\mu\text{g/kg}$	
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
0.1	5.8 \pm 0.8	9.0 \pm 0.6*	11.0 \pm 0.7**
0.3	11.4 \pm 1.4	13.0 \pm 1.1	16.0 \pm 1.3*
1	16.0 \pm 2.9	22.6 \pm 2.4	24.6 \pm 3.0
3	29.0 \pm 5.5	40.8 \pm 5.3	40.6 \pm 4.0
10	50.2 \pm 9.5	68.6 \pm 7.1	74.2 \pm 4.4
30	77.4 \pm 10.2	102.6 \pm 4.3	109.0 \pm 4.2*
100	113.2 \pm 7.3	135.0 \pm 7.3	139.4 \pm 3.6*
300	152.0 \pm 1.5	169.4 \pm 9.7	171.8 \pm 6.1*

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

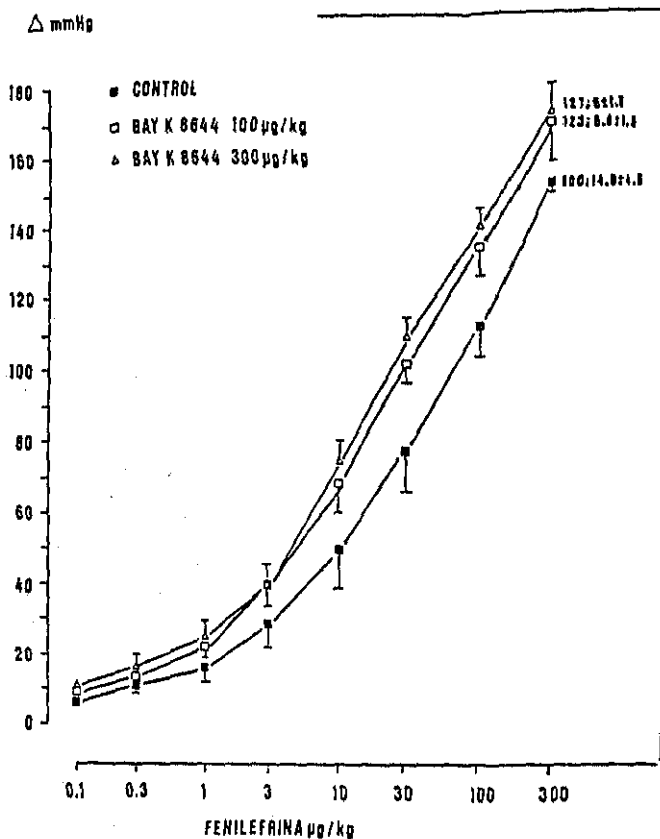


FIGURA 23.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por fenilefrina iv. en "pithed-rat". Control (■), después del tratamiento ia. con distintas dosis de BAY K 8644: 100 μg/kg (□), 300 μg/kg (▲). Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE₅₀ (μg/kg).

El incremento de la PSD producido por los Ag α_1 , no varió significativamente cuando éstos fármacos se administraban después del tratamiento iv. con 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8. Por otra parte el incremento de la PSD en ratas tratadas con 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina y con 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8, no presentó diferencia significativa con el incremento obtenido en ratas tratadas únicamente con 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. de nifedipina. Siempre que se administraban los Ag α_1 , en ratas tratadas con 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina, el incremento de la PSD era significativamente menor que el valor control, pero como acabamos de señalar el tratamiento con 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8 no aumentó esta diferencia. (Tablas 16 y 17 págs. 110 y 112, Figuras 24 y 25 págs. 111 y 113).

TABLA 16

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR METOXAMINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON TMB-8 Y NIFEDIPINA.

METOXAMINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 (3000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA (1000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8(3000 $\mu\text{g/kg}$) + NIFEDIPINA(1000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$
1	2.7 \pm 0.3	4.4 \pm 0.9	1.4 \pm 0.2*	2.2 \pm 0.6
3	5.3 \pm 0.4	6.0 \pm 0.6	2.0 \pm 0.0***	3.4 \pm 0.4**
10	9.7 \pm 0.8	10.2 \pm 1.7	3.0 \pm 0.3***	4.0 \pm 0.5***
30	16.3 \pm 1.8	22.0 \pm 4.7	6.0 \pm 1.5**	8.6 \pm 1.2**
100	56.2 \pm 5.6	50.0 \pm 10.1	22.6 \pm 4.8**	22.8 \pm 1.7***
300	108.3 \pm 4.3	95.4 \pm 7.5	54.0 \pm 7.3***	63.6 \pm 4.3***
1000	127.7 \pm 4.7	118.0 \pm 8.8	98.2 \pm 7.3**	111.8 \pm 5.5

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

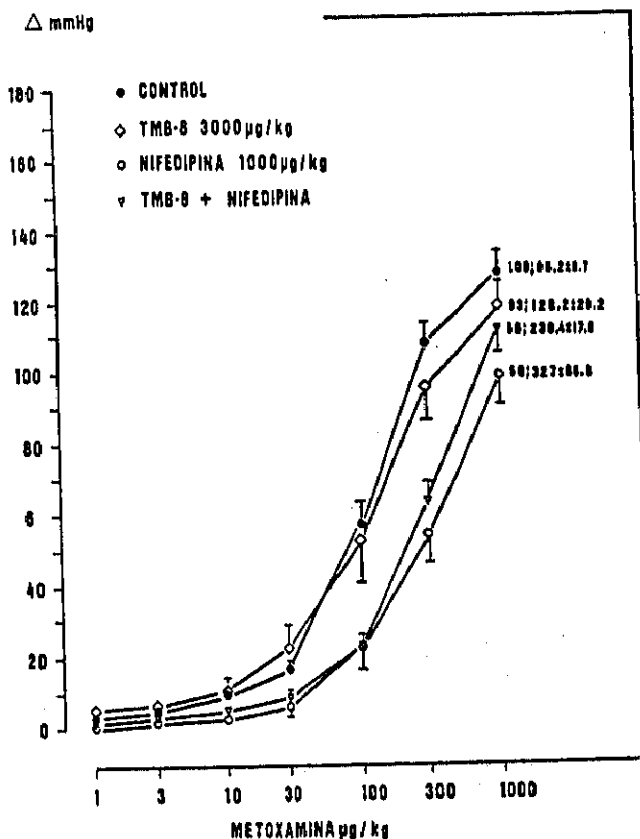


FIGURA 24.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por metoxamina iv. en "pithed-rat". Control (●), después del tratamiento iv. con TMB-8 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (◇), después del tratamiento ia. con nifedipina 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (○), y después del tratamiento ia. con TMB-8 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iv. y nifedipina 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ia. (▽). Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

TABLA 17

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR FENILEFRINA, DESPUES DE TRATAMIENTO CON TMB-8 Y NIFEDIPINA.

FENILEFRINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 (3000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA (1000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8(3000 $\mu\text{g/kg}$) + NIFEDIPINA(1000 $\mu\text{g/kg}$) $\bar{x} \pm \text{ESM}$
0.1	5.8 \pm 0.8	5.8 \pm 0.9	1.4 \pm 0.3***	2.4 \pm 0.4**
0.3	11.4 \pm 1.4	8.8 \pm 1.3	3.4 \pm 0.4***	4.0 \pm 0.6**
1	16.0 \pm 2.9	15.6 \pm 2.7	4.4 \pm 0.4**	5.6 \pm 0.6**
3	29.0 \pm 5.5	25.6 \pm 4.3	8.0 \pm 0.6**	9.8 \pm 0.2**
10	50.2 \pm 9.5	44.2 \pm 5.5	15.8 \pm 1.6**	18.4 \pm 0.6**
30	77.4 \pm 10.2	67.4 \pm 10.2	35.8 \pm 2.9**	29.8 \pm 3.8**
100	113.2 \pm 7.3	109.0 \pm 13.3	69.6 \pm 4.6***	56.8 \pm 4.5***
300	152.0 \pm 1.5	141.6 \pm 13.1	107.0 \pm 7.6***	91.8 \pm 1.1***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

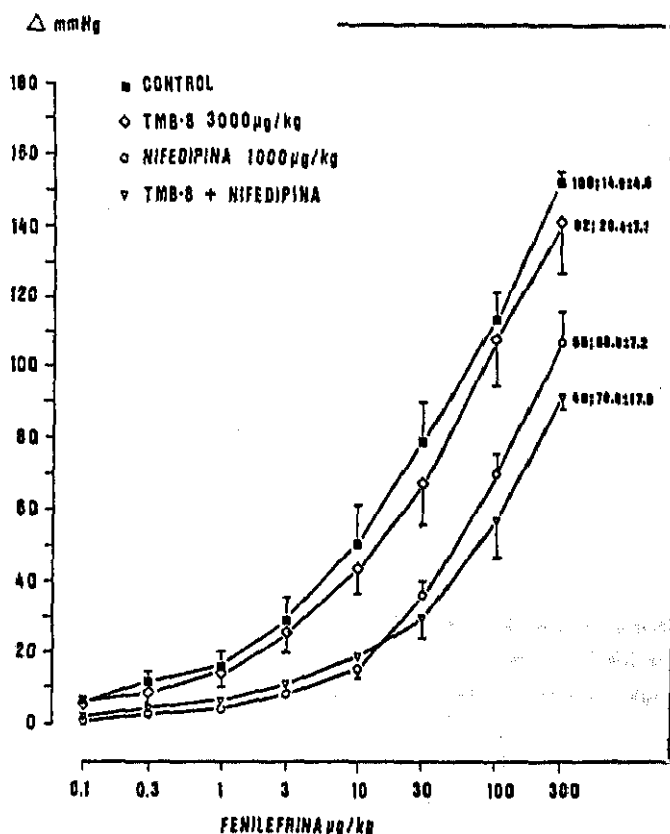


FIGURA 25.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por fenilefrina iv. en "pithed-rat". Control (■), después del tratamiento iv. con TMB-8 3000 µg/kg (◇), después del tratamiento ia. con nifedipina 1000 µg/kg (○), y después del tratamiento con TMB-8 3000 µg/kg iv. y nifedipina 1000 µg/kg ia. (▽). Los símbolos representan la media ± error estándar de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (µg/kg).

C) Ensayos con $Ag\alpha_2$ selectivos:

Los $Ag\alpha_2$ (B-HT 920 y B-HT 933) produjeron un incremento dosis-dependiente de la PSD en "pithed-rat". El incremento máximo conseguido después de la administración de los $Ag\alpha_2$ fue menor que el incremento máximo obtenido con los $Ag\alpha_1$. La respuesta a los $Ag\alpha_2$ tardó en aparecer algo más que la respuesta a los $Ag\alpha_1$, aunque también apareció poco tiempo después de la administración. Después de producir el incremento presor con $Ag\alpha_2$, en general no se conseguía recuperar el nivel de PSD anterior a la administración, quedando la PSD estabilizada en un nivel más alto.

El incremento de la PSD producido por los $Ag\alpha_2$ fue menor cuando estos fármacos se administraban después de tratamiento con nifedipina i.v., existiendo ya diferencia estadística con los controles para todas las dosis de los $Ag\alpha_2$, cuando se utilizaba en la infusión la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina. La inhibición producida fue más acusada que la inhibición producida por nifedipina cuando se administraban $Ag\alpha_1$, y existió una inhibición prácticamente completa del efecto presor de los $Ag\alpha_2$ cuando se infundía una dosis 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. de nifedipina. Por consiguiente los desplazamientos a la derecha de las curvas dosis-respuesta de los $Ag\alpha_2$ fueron mayores que los desplazamientos de las curvas de $Ag\alpha_1$ por nifedipina. (Tablas 18 y 19 págs. 115 y 117, Figuras 26 y 27 págs. 116 y 118).

TABLA 18

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR B-HT 920, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE NIFEDIPINA.

B-HT 920 µg/kg	NIFEDIPINA µg/kg			
	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	1000 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
0.3	8.0 ± 1.0	4.0 ± 0.3*	0.5 ± 0.0***	0.0 ± 0.0***
1	9.7 ± 0.7	5.4 ± 0.3**	1.1 ± 0.1***	0.8 ± 0.2***
3	14.5 ± 1.2	7.4 ± 0.4***	2.0 ± 0.4***	1.7 ± 0.2***
10	28.8 ± 2.6	16.0 ± 1.3**	4.0 ± 0.5***	3.4 ± 0.3***
30	48.3 ± 2.3	28.0 ± 1.7***	6.0 ± 0.6***	5.4 ± 0.5***
100	70.7 ± 2.0	51.4 ± 4.1**	9.8 ± 1.0***	7.8 ± 0.5***
300	85.7 ± 1.5	61.8 ± 5.4**	14.2 ± 1.7***	9.6 ± 0.9***

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05

**p < 0.01

***p < 0.001

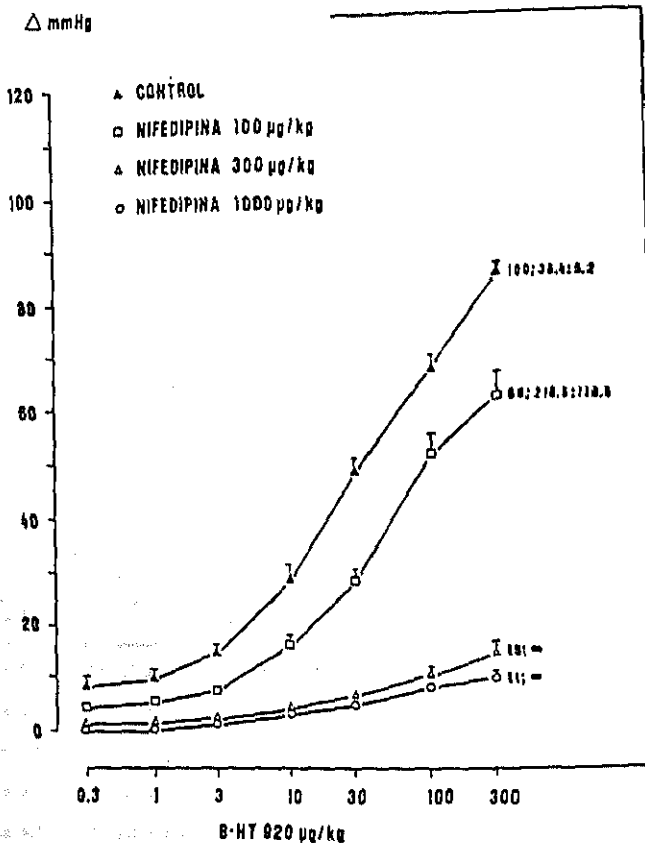


FIGURA 26.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por B-HT 920 iv. en "pithed-rat". Control (▲); después del tratamiento la. con distintas dosis de nifedipina: 100 μg/kg (□), 300 μg/kg (△), y 1000 μg/kg (○). Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-8 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (μg/kg).

TABLA 19

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR 8-HT 933, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE NIFEDIPINA.

8-HT 933 µg/kg	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA µg/kg		
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	1000 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
3	4.7 ± 0.2	2.8 ± 0.7*	2.6 ± 0.7*	0.0 ± 0.0***
10	8.2 ± 0.7	3.6 ± 0.6***	3.2 ± 0.8***	0.2 ± 0.2***
30	11.2 ± 1.3	5.0 ± 0.8**	4.6 ± 1.0**	0.6 ± 0.4***
100	18.0 ± 1.8	7.8 ± 1.0***	7.4 ± 1.1***	1.6 ± 0.7***
300	36.2 ± 4.6	13.8 ± 1.2**	13.0 ± 1.9**	3.8 ± 1.0***
1000	58.8 ± 6.8	25.2 ± 2.6**	21.2 ± 2.9**	5.8 ± 1.6***
3000	76.3 ± 6.0	38.6 ± 3.5**	27.0 ± 3.8**	8.4 ± 1.9***

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

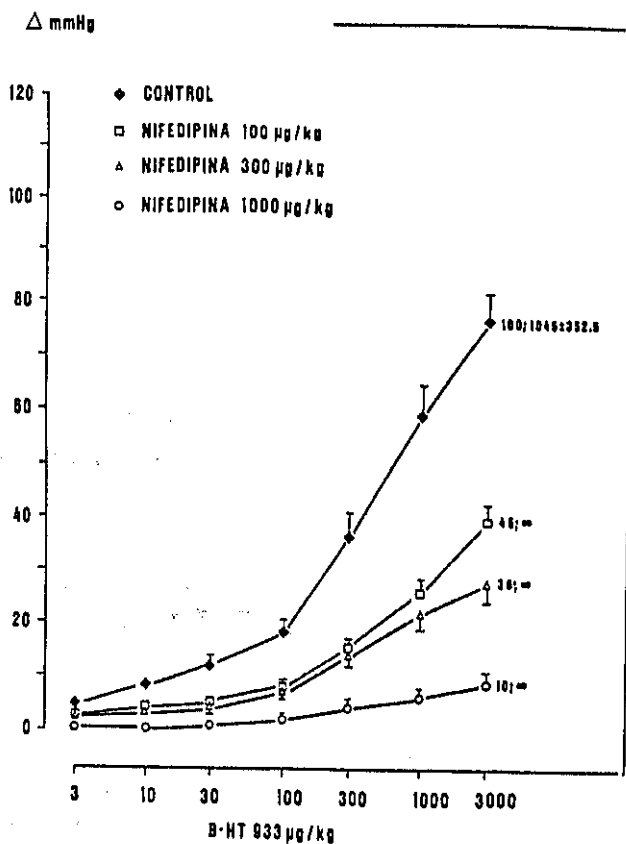


FIGURA 27.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por B-HT 933 iv. en "pithed-rat". Control (◆), después del tratamiento la. con distintas dosis de nifedipina: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (□), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (△), y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (○). Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

El incremento de la PSD producido por los $Ag\alpha_2$ fue mayor cuando estos fármacos se administraban después de tratamiento con BAY K 8644 la.; existiendo para casi todas las dosis de ambos $Ag\alpha_2$ diferencia estadística con los controles, cuando se utilizaba la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la infusión de BAY K 8644, y existiendo también diferencia estadística para casi todas las dosis del compuesto B-HT 933 cuando se infundían 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BAY K 8644. Por consiguiente, existió un desplazamiento a la izquierda de las curvas dosis-respuestas de los $Ag\alpha_2$ por BAY K 8644, y este desplazamiento fue más acusado para el compuesto B-HT 933 (Tablas 20 y 21 págs 120 y 122, Figuras 26 y 29 págs 121 y 123).

TABLA 20

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR B-HT 920, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE BAY K 8644.

B-HT 920 μg/kg	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 μg/kg	
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
0.3	8.0 ± 1.0	7.2 ± 0.7	12.8 ± 0.4**
1	9.7 ± 0.9	9.4 ± 0.8	17.8 ± 1.3**
3	14.5 ± 1.2	15.4 ± 1.0	24.2 ± 2.0**
10	28.8 ± 2.6	30.4 ± 1.2	42.8 ± 2.5**
30	48.3 ± 2.3	51.2 ± 2.2	61.6 ± 2.3**
100	70.7 ± 2.0	70.8 ± 1.5	80.8 ± 3.1*
300	85.7 ± 1.5	82.8 ± 3.4	89.6 ± 4.7

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

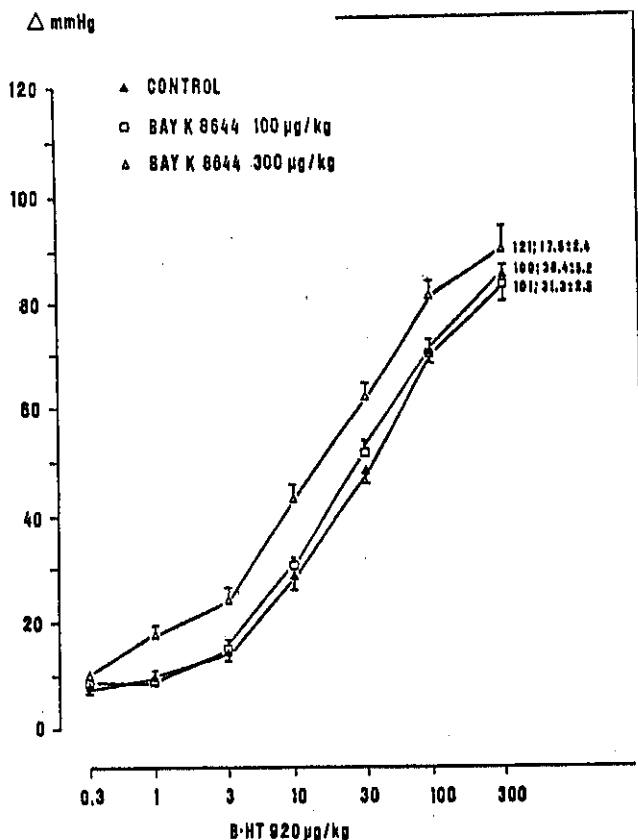


FIGURA 28.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por B-HT 920 iv. en "pithed-rat". Control (▲), después del tratamiento la. con distintas dosis de BAY K 8644: 100 μg/kg (□), 300 μg/kg (△). Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE₅₀ (μg/kg).

TABLA 21

INCREMENTO DE LA PRESION SANGUINEA DIASTOLICA (mm Hg) EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR B-HT 933, DESPUES DE TRATAMIENTO CON DISTINTAS DOSIS DE BAY K 8644.

B-HT 933 $\mu\text{g/kg}$	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 $\mu\text{g/kg}$	
		100 $\bar{x} \pm \text{ESM}$	300 $\bar{x} \pm \text{ESM}$
3	4.7 \pm 0.2	7.5 \pm 0.3***	9.7 \pm 0.9***
10	8.2 \pm 0.7	11.7 \pm 0.7**	13.0 \pm 1.4**
30	11.2 \pm 1.3	18.7 \pm 1.4**	19.7 \pm 1.6**
100	18.0 \pm 1.8	29.8 \pm 2.1**	33.0 \pm 2.2***
300	36.2 \pm 4.6	49.8 \pm 1.4**	56.5 \pm 2.3**
1000	58.8 \pm 6.8	71.8 \pm 1.6	76.2 \pm 1.9*
3000	76.3 \pm 6.0	84.7 \pm 2.9	86.8 \pm 1.9*

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

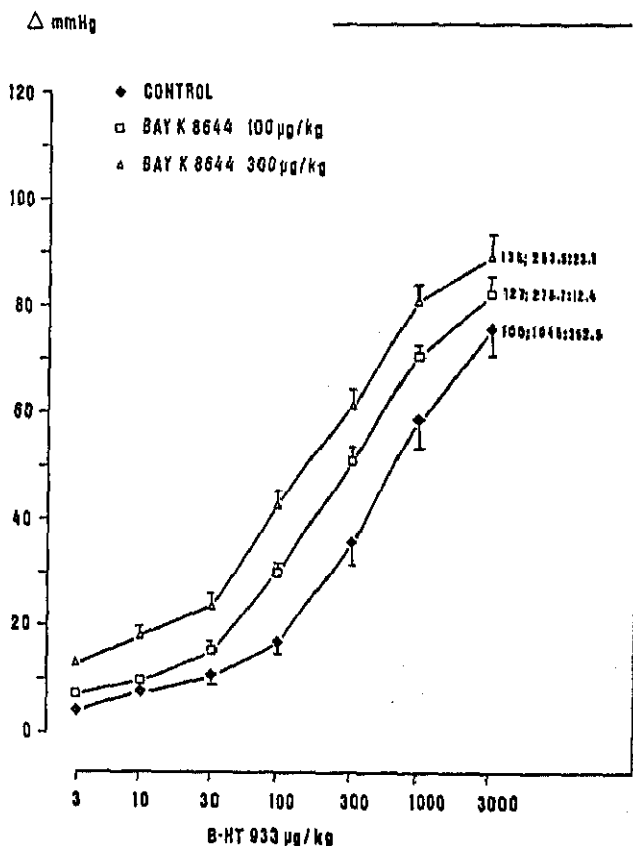


FIGURA 29.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento en la presión sanguínea diastólica producido por B-HT 933 iv. en "pithed-rat". Control (◆), después del tratamiento la. con distintas dosis de BAY K 8644: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (□), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Δ). Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo la curva (área bajo la curva control = 100 %), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

En la Tabla 22 se presenta la relación entre la DE_{50} de cada agonista α después de los distintos tratamientos y su DE_{50} control en "pithed-rat".

TABLA 22

($\mu\text{g/kg}$)	METOXAMINA	FENILEFRINA	B-HT 920	B-HT 933
NIFEDIPINA 100	1.94 ± 0.28	2.28 ± 0.44	6.0 ± 3.45	∞
NIFEDIPINA 300	2.20 ± 0.50	3.78 ± 0.44	∞	∞
NIFEDIPINA 1000	3.44 ± 0.68	4.06 ± 0.49	∞	∞
BAY K 8644 100	0.93 ± 0.07	0.39 ± 0.10	0.86 ± 0.06	0.27 ± 0.01
BAY K 8644 300	0.71 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.24 ± 0.02
TMB-8 3000	1.36 ± 0.31	1.38 ± 0.48	---	---
TMB-8 3000 + NIFEDIPINA 1000	2.52 ± 0.18	4.72 ± 0.94	---	---

La relación se obtiene del cociente DE_{50} del agonista con tratamiento / DE_{50} del agonista sin tratamiento (DE_{50} control).

La DE_{50} se estima como la dosis necesaria para elevar la presión sanguínea diastólica 50 mm Hg.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

Las Figuras 30 y 31 son una recopilación de registros de ensayos con $Ag\alpha_1$ en "pithed-rat", llevados a cabo despues de los distintos tratamientos.

FIGURA 30.- Registros del incremento de la PSD en "pithed-rat" por la administración de metoxamina (págs. 126, 127, 128,129).

A) Control

B) Despues de tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina ia.

C) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

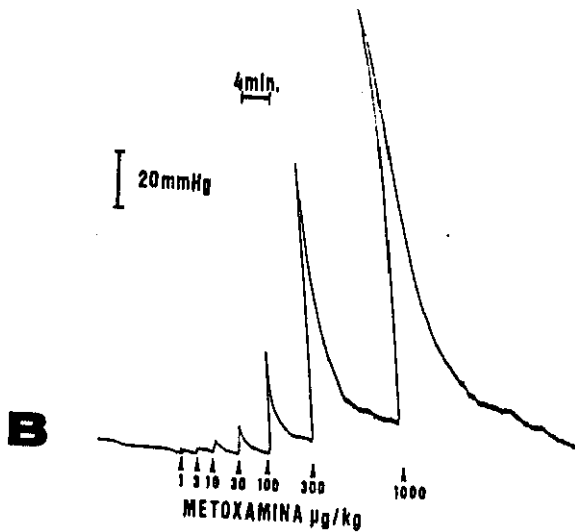
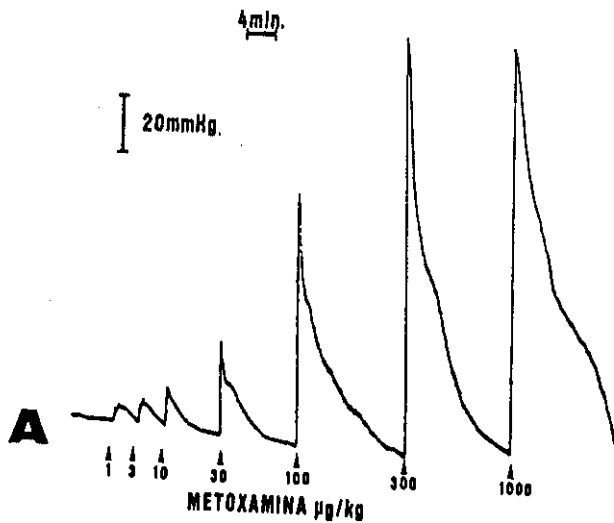
D) " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

E) " " 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BAY K 8644 ia.

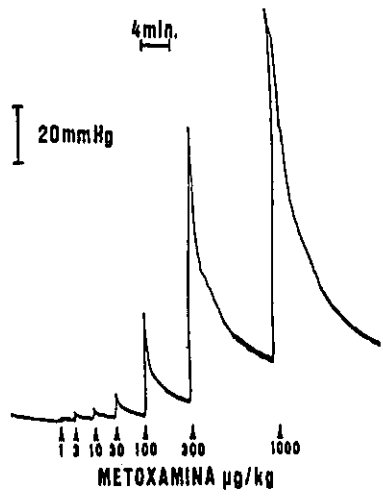
F) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

G) " " 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8 iv.

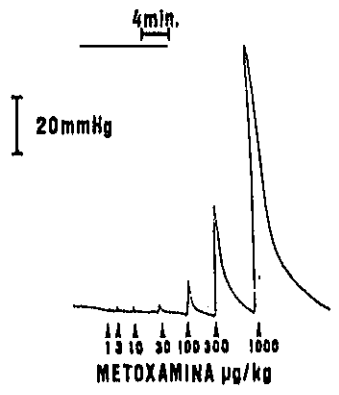
H) " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina ia. y 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8 iv.



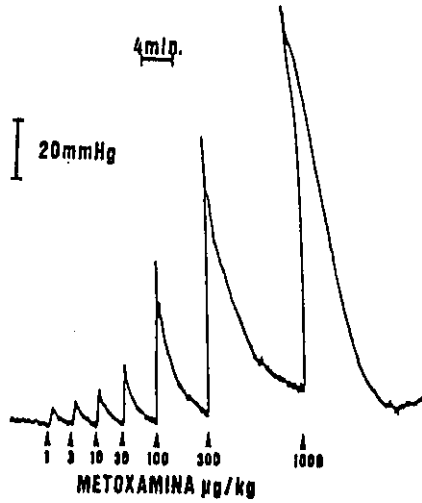
C



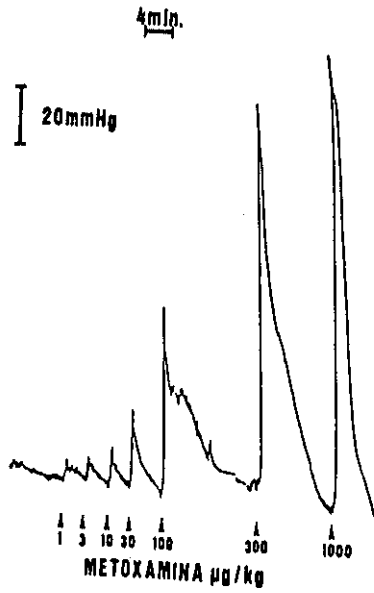
D



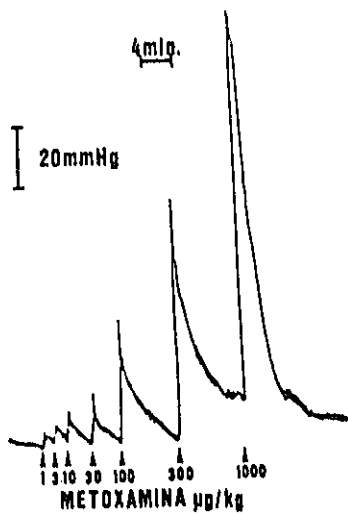
E



F



G



H

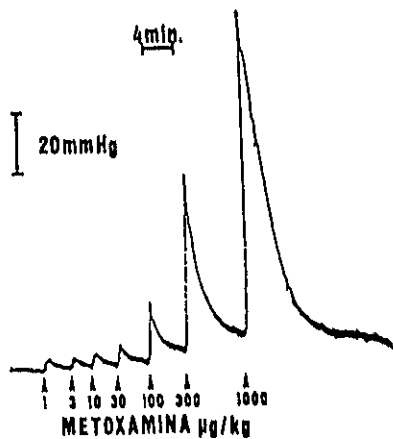


FIGURA 31.- Registros del incremento de la PSD en "pithed-rat" por la administración de tetrafrina (págs 131, 132, 133, 134).

A) Control

B) Despues de tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina la.

C) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

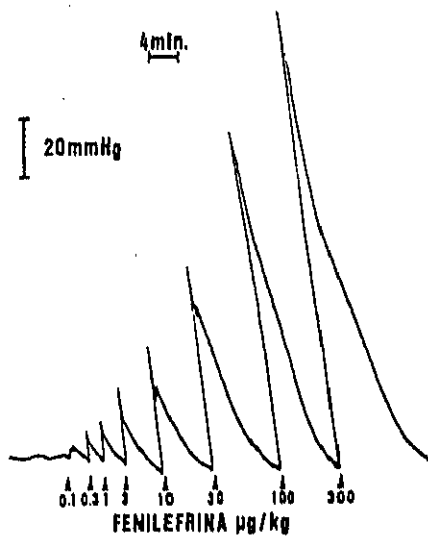
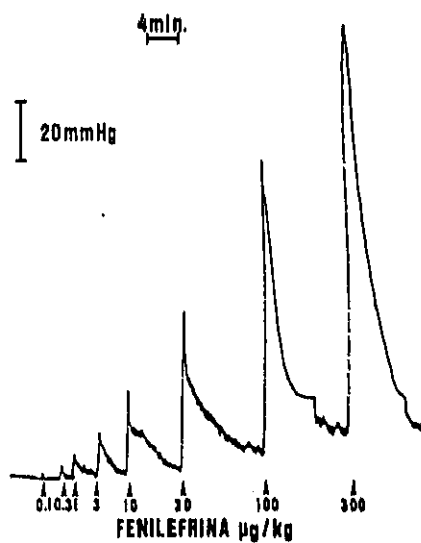
D) " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

E) " " 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BAY K 8644 la.

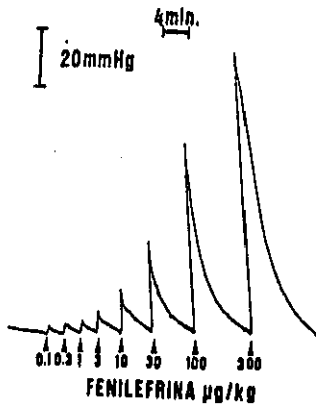
F) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

G) " " 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8 lv.

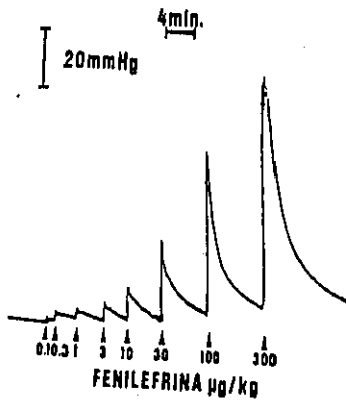
H) " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina la. y 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TMB-8 lv.

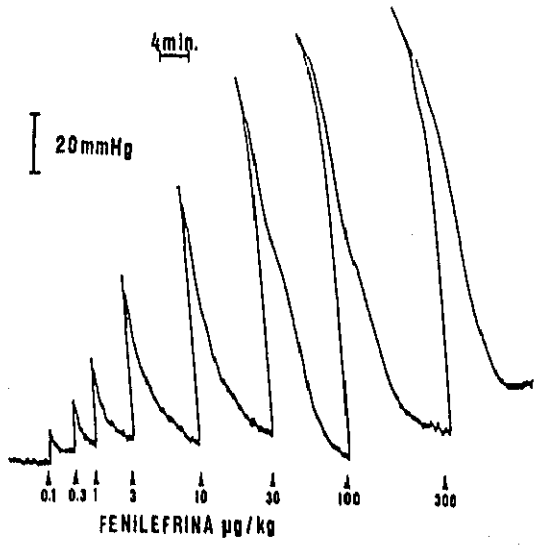
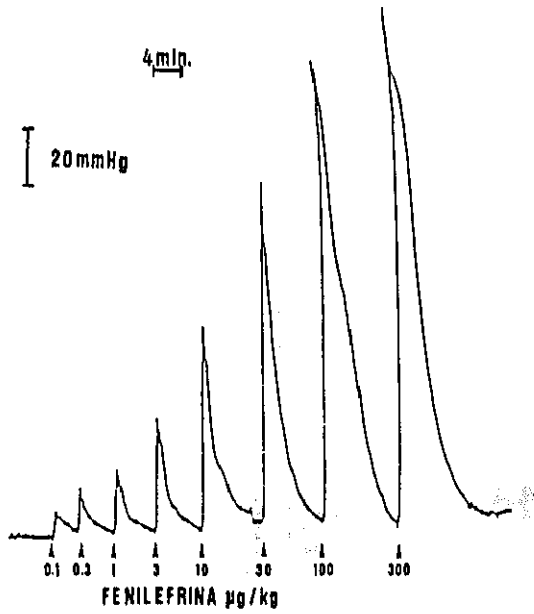
A**B**

C

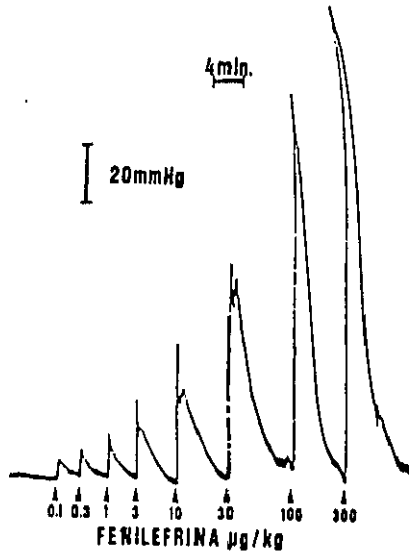


D

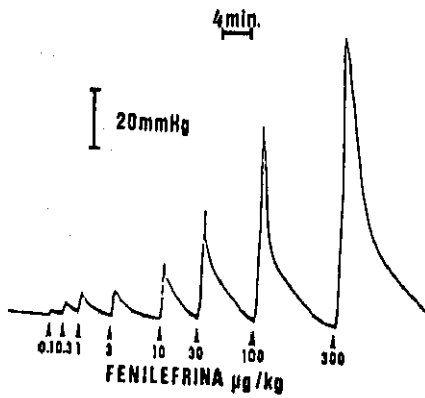


E**F**

G



H



Las Figuras 32 y 33 son una recopilación de registros de ensayos con $Ag\alpha_2$ en "pithed-rat" llevados a cabo despues de distintos tratamientos.

FIGURA 32.- Registros del incremento de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por administración de B-HT 920 (págs. 136 y 137).

A) Control

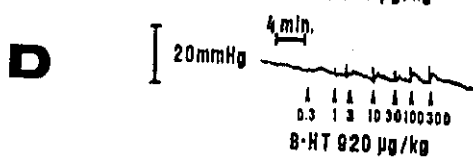
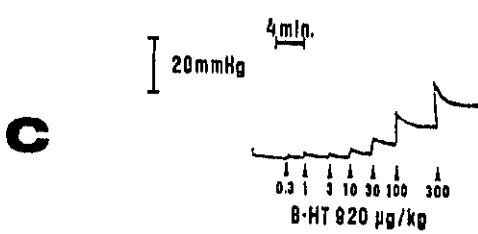
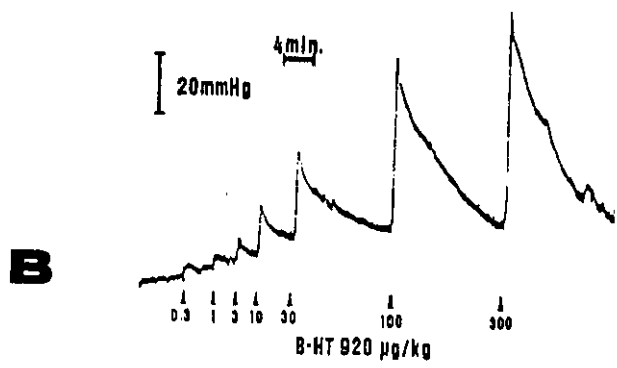
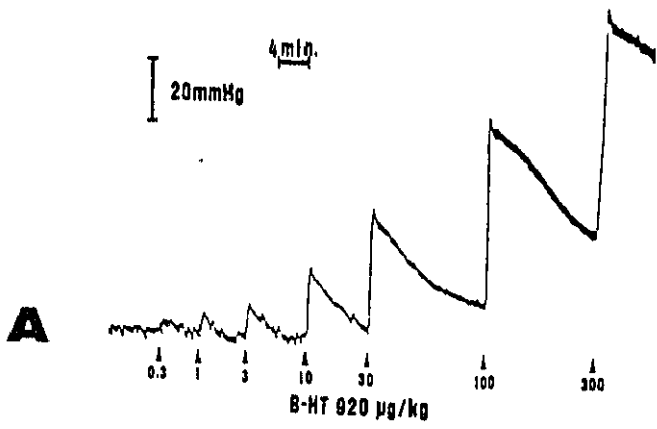
B) Despues de tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina ia.

C) " " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

D) " " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

E) " " " 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BAY K 8644 ia.

F) " " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "



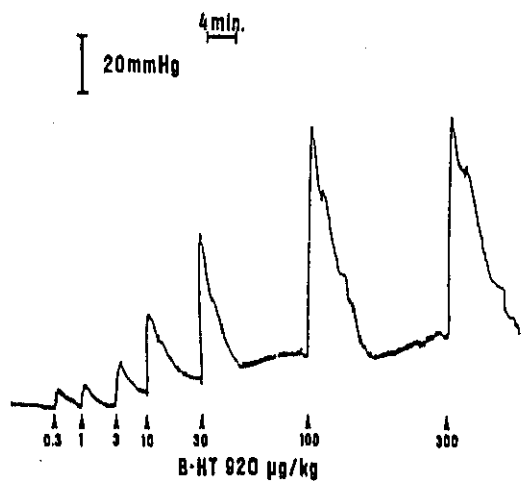
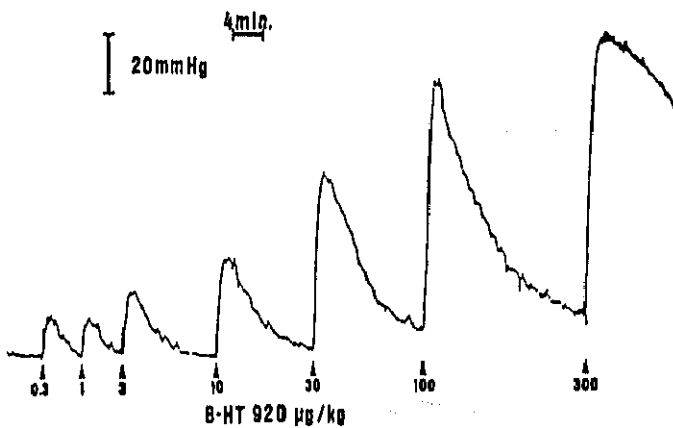
E**F**

FIGURA 33.- Registros del incremento de la PSD en "pithed-rat" por administración de B-HT 933 (págs. 139, 140).

A) Control.

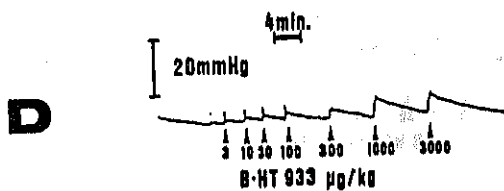
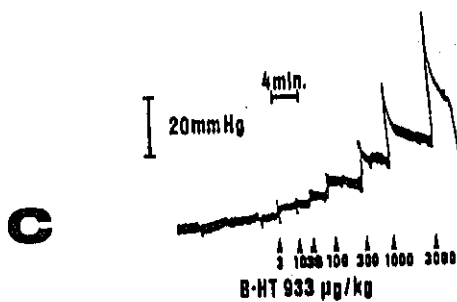
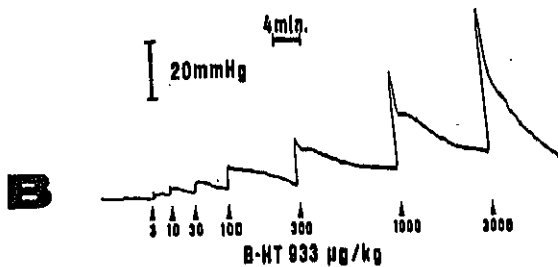
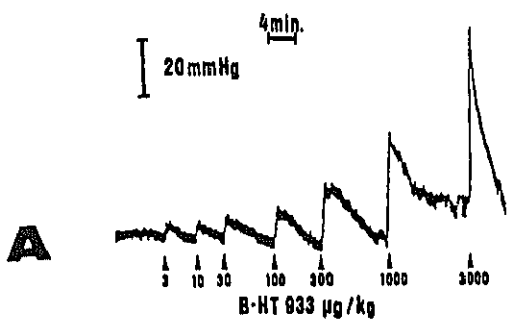
B) Despues de tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nifedipina ia.

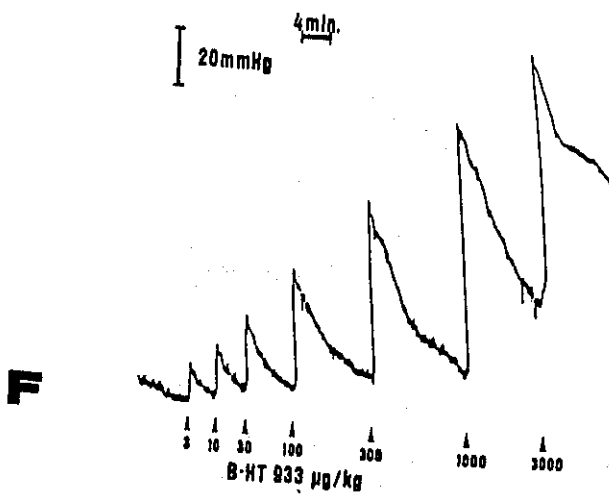
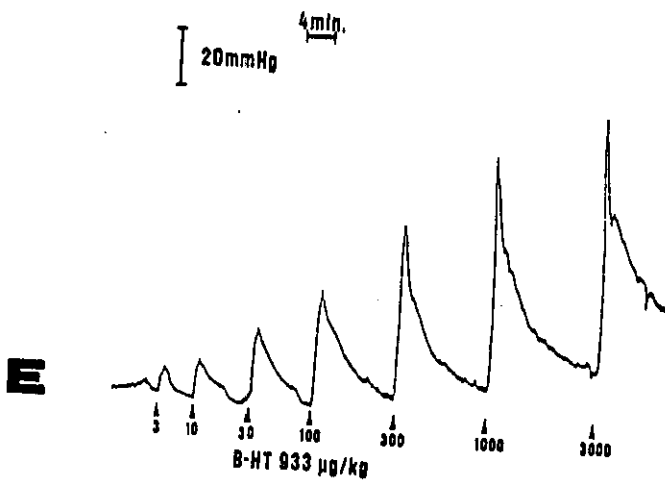
C) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

D) " " 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "

E) " " 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BAY K 8644 ia.

F) " " 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ " "





3.2.- RESULTADOS EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO

Recordemos que en la preparación de anillos de aorta de conejo hemos llevado a cabo tres grupos de ensayos:

- A) Ensayos con CIK.
- B) Ensayos con Ag α_1 selectivos.
- C) Ensayos con Ag α_2 selectivos.

A continuación expondremos los resultados correspondientes a estos tres grupos de ensayos.

A) Ensayos con CIK :

Quando elevabamos la concentración de CIK en el baño de órganos hasta un valor 15 mM la preparación de anillos de aorta de conejo no se contraía. Cuando la concentración de CIK en el baño era 30 mM la preparación se contraía alcanzando las contracciones una altura igual a 77.9 ± 3.6 % (n=7) del valor máximo de altura alcanzada por administración de CIK. Cuando se alcanzaba una concentración 60 mM de CIK se obtenía una contracción muy cercana a la máxima posible por administraciones de CIK, con altura de 98.1 ± 1.2 % (n=7) del valor máximo. Se alcanzó la contracción de altura máxima cuando la concentración alcanzada era 80 mM de CIK, que consideramos el 100 % de altura contráctil. Concentraciones mayores de 80 mM no conseguían en ningún caso producir mayor contracción.

La concentración 10^{-6} M del AgCa BAY K 8644 fue capaz de potenciar la contracción producida por CIK 30 mM y 60 mM, apareciendo además contracción en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M con CIK 15 mM (Tabla 23 pág. 142).

TABLA 23

PORCENTAJE DE CONTRACCION PRODUCIDO POR CIK EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BAY K 8644.

CIK [mM]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 [M]		
		10^{-6} $\bar{x} \pm \text{ESM}$	10^{-7} $\bar{x} \pm \text{ESM}$	10^{-8} $\bar{x} \pm \text{ESM}$
15	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	23.6 ± 7.7*	45.3 ± 3.2***
30	77.9 ± 3.6	70.4 ± 2.5	86.9 ± 7.6*	96.7 ± 1.1***
60	98.1 ± 1.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
80	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

Cuando se administraba ClK 80 mM siete veces sucesivas en la misma preparación pudimos comprobar que las alturas alcanzadas por la segunda y la tercera administración eran mayores que la altura alcanzada después de la primera administración de ClK. Existió diferencia significativa entre la altura de la primera contracción y la altura de la segunda contracción de ClK 80 mM ($p < 0.01$). Existió también diferencia significativa entre la segunda y la tercera contracción de ClK 80 mM ($p < 0.05$); pero no existió diferencia significativa entre la altura después de la tercera administración y las siguientes. Es decir, que las alturas de la cuarta, quinta, sexta y séptima contracción eran similares a la altura de la tercera, y por este motivo se utilizó la tercera administración como control en los ensayos que evalúan el efecto de fármacos sobre contracciones de ClK 80 mM (Tabla 24 pág. 144).

TABLA 24

PORCENTAJES DE CONTRACCION PRODUCIDOS POR SUCESIVAS DOSIS DE CIK EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO.

ADMINISTRACION DE CIK 80 mM	% DE DESPOLARIZACION $\bar{x} \pm \text{ESM}$
1ª	100.0 \pm 0.0
2ª	112.1 \pm 3.3
3ª	134.8 \pm 6.9
4ª	138.8 \pm 4.2
5ª	141.1 \pm 6.3
6ª	142.1 \pm 6.1
7ª	146.1 \pm 8.1

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 8 ensayos.

La nifedipina inhibió la contracción producida por CIK 80 mM en forma dosis dependiente (Tabla 25).

La concentración 10^{-6} M del AgCa BAY K 8644 no modificó la contracción producida por CIK 80 mM en forma significativa. La diferencia en altura entre la tercera y la cuarta administración de CIK 80 mM en ensayos control fue 6.4 ± 1.9 % (n=8), y en los ensayos realizados administrando la cuarta vez CIK 80 mM en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M la diferencia correspondiente fue 7.3 ± 3.3 % (n=8).

TABLA 25

INHIBICION DE LA CONTRACCION PRODUCIDA POR CIK 80 mM EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NIFEDIPINA.

NIFEDIPINA [M]	% DE INHIBICION $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^0	0.0 ± 2.6
10^6	6.43 ± 4.3
10^7	45.7 ± 5.4
10^4	52.0 ± 5.9

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

Cuando se utilizaban concentraciones comprendidas entre 10^3M y 10^4M , el compuesto TMB-8 inhibió la contracción producida por CIK 80 mM en forma dosis dependiente (Tabla 26).

TABLA 26

INHIBICION DE LA CONTRACCION PRODUCIDA POR CIK 80 mM EN PRESENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE TMB-8.

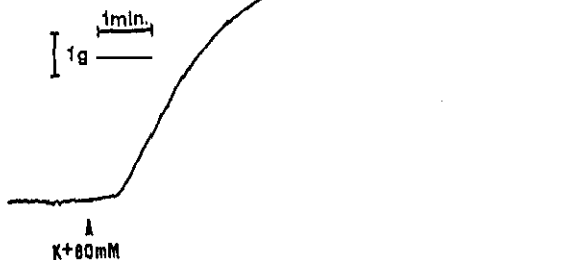
TMB-8 [M]	% DE INHIBICION $\bar{x} \pm ESM$
10^5	1.6 ± 1.0
1.8×10^5	8.9 ± 1.4
3×10^5	16.0 ± 2.3
5.5×10^5	31.6 ± 1.9
10^4	56.9 ± 2.8

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 8 ensayos.

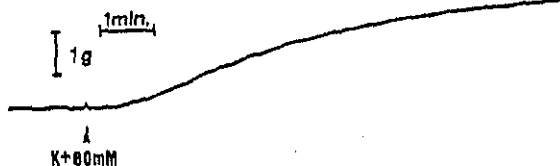
Cuando se incubaba la preparación con TMB-8 10^4M y BAY K 8644 10^9M , la contracción producida por CIK 80 mM alcanzaba mayor altura que la alcanzada cuando la preparación se incubaba sólo con TMB-8 10^4M , teniendo en este caso la inhibición un valor de 36.0 ± 3.2 ($n = 7$), presentando este valor diferencia estadística ($p < 0.001$) respecto al porcentaje de inhibición en preparaciones incubadas sólo con TMB-8 10^4M (Figura 34 pág.147).

***INCUBACION**

(A) *CONTROL



(B) *TMB-8



(C) *TMB-8+BAY K 8644



FIGURA 34.- Registros de las contracciones de CK 80 mM en una preparación de anillos de aorta de conejo: (A) Control, (B) después de incubar la preparación con TMB-8 10^{-4} M, (C) después de incubar la preparación con TMB-8 10^{-4} M y BAY K 8644 10^{-4} M.

B) Ensayos con Ag α , selectivos.

La metoxamina y la fenilefrina contrajeron en forma dosis dependiente la preparación de anillos de aorta de conejo. Estos fármacos produjeron un aumento de tono vascular rápido al principio, y de desarrollo más lento unos minutos después de la administración. Cuando se alcanzaban las concentraciones más elevadas en las curvas dosis-respuestas, usualmente no se observaba el brusco ascenso inicial (Figura 35 pág. 149). La respuesta de estos fármacos no se modificó significativamente en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M. En presencia de nifedipina 10^{-6} M la respuesta de metoxamina fue menor que la respuesta control, siendo la diferencia significativa con concentraciones altas de metoxamina ($\geq 10^{-6}$ M). Por el contrario la respuesta de fenilefrina en presencia de nifedipina 10^{-6} M no presentó diferencia con la respuesta control (Tablas 27 y 28 págs. 150 y 151, Figuras 36 y 37 págs. 153 y 154).

Cuando se trabajaba con líquido nutritivo sin calcio y con EGTA 0.5 mM, los Ag α , metoxamina y fenilefrina fueron capaces de contraer la preparación de anillos de aorta de conejo en forma dosis dependiente, pero la contracción fue menor que la producida en condiciones control, existiendo diferencia significativa para todas las dosis utilizadas de ambos agonistas (Tablas 29 y 30 pág. 152 , Figuras 36 y 37 págs. 153 y 154 págs.).

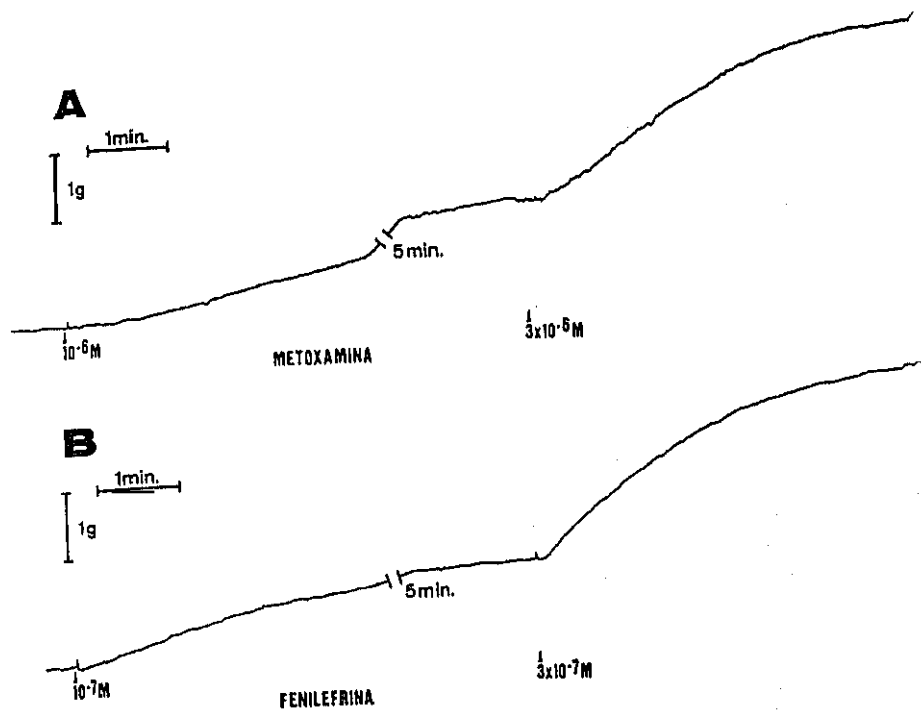


FIGURA 35.- Registro de la contracción en anillos de aorta de conejo por administración de metoxamina (A) y fenilefrina (B).

TABLA 27

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE NIFEDIPINA Y BAY K 8644.

METOXAMINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA 10^{-6}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 10^{-6}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-6}	66.5 ± 6.1	66.0 ± 4.7	79.6 ± 2.8
3×10^{-6}	104.9 ± 5.8	95.0 ± 4.4	105.7 ± 2.8
10^{-5}	131.5 ± 4.5	$113.0 \pm 4.1^{**}$	128.6 ± 2.2
3×10^{-5}	145.1 ± 4.4	$119.5 \pm 3.7^{***}$	137.7 ± 3.2
10^{-4}	149.5 ± 4.1	$121.2 \pm 3.7^{***}$	141.9 ± 3.4
3×10^{-4}	150.6 ± 4.1	$121.2 \pm 3.7^{***}$	145.4 ± 3.7

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TABLA 28

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE NIFEDIPINA Y BAY K 8644.

FENILEFRINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	NIFEDIPINA 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	BAY K 8644 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10 ⁻⁷	51.0 ± 5.4	42.0 ± 3.6	68.3 ± 9.3
3 x 10 ⁻⁷	91.4 ± 6.4	78.1 ± 3.7	104.5 ± 6.7
10 ⁻⁶	117.1 ± 6.0	104.5 ± 4.6	124.5 ± 7.3
3 x 10 ⁻⁶	135.4 ± 4.0	124.8 ± 6.6	144.0 ± 2.0
10 ⁻⁵	143.8 ± 3.8	138.8 ± 8.1	149.0 ± 3.9
3 x 10 ⁻⁵	146.2 ± 3.6	142.1 ± 8.5	150.6 ± 4.6

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

TABLA 29

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN LIQUIDO
NUTRICIO SIN CALCIO Y CON EGTA 0.5 mM.

METOXAMINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	SIN CALCIO + EGTA 0.5 mM $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-6}	66.5 \pm 6.1	5.4 \pm 1.0***
3×10^{-6}	104.9 \pm 5.8	12.6 \pm 1.0***
10^{-5}	131.5 \pm 4.5	20.3 \pm 1.8***
3×10^{-5}	145.1 \pm 4.4	26.3 \pm 2.0***
10^{-4}	149.5 \pm 4.1	34.3 \pm 2.6***
3×10^{-4}	150.6 \pm 4.1	40.1 \pm 2.5***

TABLA 30

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN LIQUIDO
NUTRICIO SIN CALCIO Y CON EGTA 0.5 mM.

FENILEFRINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	SIN CALCIO + EGTA 0.5 mM $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-7}	51.0 \pm 5.4	2.2 \pm 0.5***
3×10^{-7}	91.4 \pm 6.4	6.9 \pm 0.9***
10^{-6}	117.1 \pm 6.0	20.8 \pm 4.3***
3×10^{-6}	135.4 \pm 4.0	41.2 \pm 4.4***
10^{-5}	143.8 \pm 3.8	55.7 \pm 5.0***
3×10^{-5}	146.2 \pm 3.6	69.6 \pm 4.6***

En ambas tablas las contracciones se valoran considerando el 100% la altura de las respuestas de ClK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

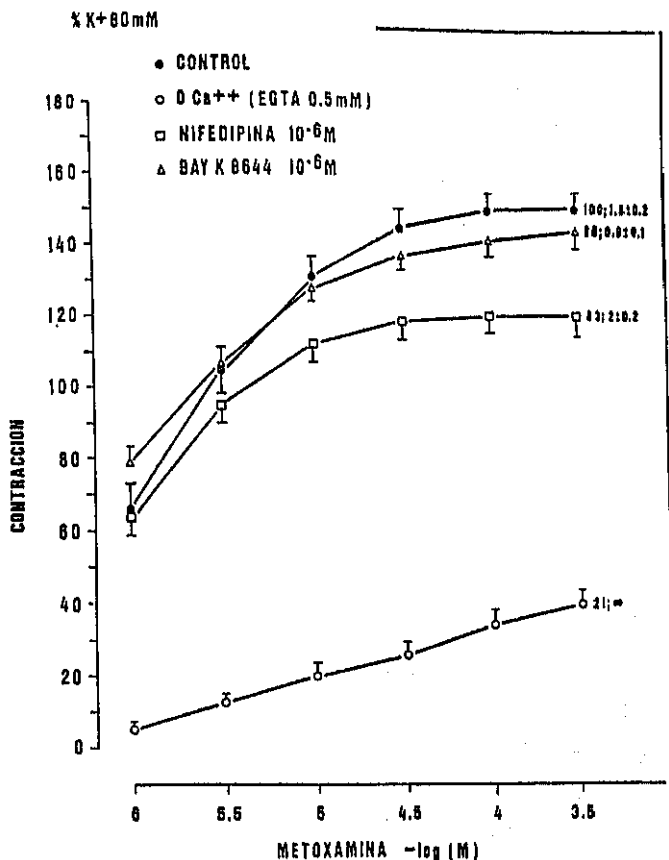


FIGURA 36.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de metoxamina en anillos de aorta de conejo. Control (●), en líquido nutritivo sin calcio y con EGTA 0.5 mM (○), en presencia de nifedipina 10⁻⁶M (□), y en presencia de BAY K 8644 10⁻⁶M (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE₅₀ (10⁻⁶M).

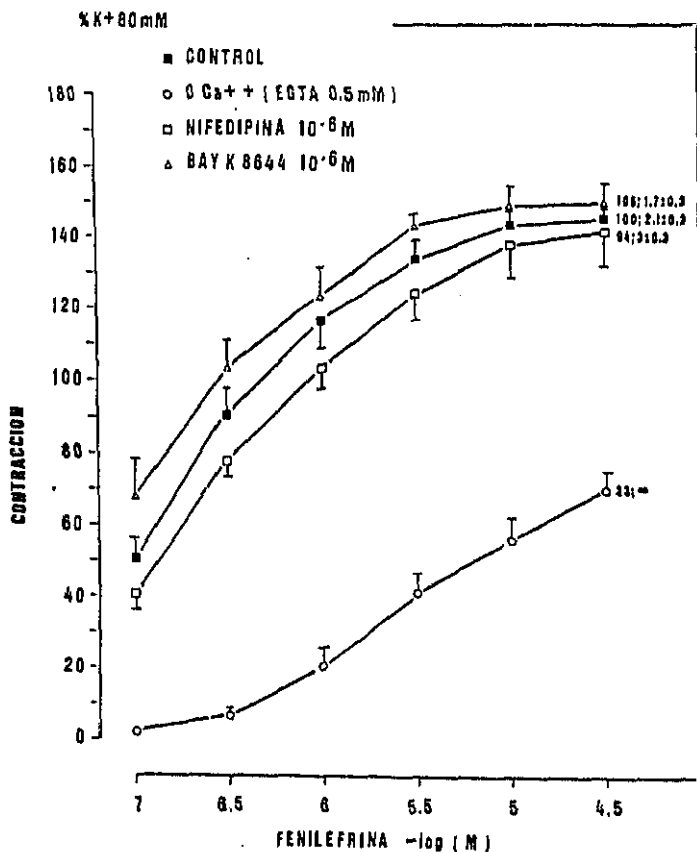


FIGURA 37.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de fenilefrina en anillos de aorta de conejo. Control (■), en líquido nutritivo sin calcio y con EGTA 0.5 mM (○), en presencia de nifedipina 10⁻⁶M (□), y en presencia de BAY K 8644 10⁻⁶M (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE₅₀ (10⁻⁷M).

El compuesto TMB-8 fue capaz de inhibir la contracción de metoxamina y fenilefrina en la preparación de anillos de aorta de conejo. La inhibición de la contracción de metoxamina fue más acusada. La contracción producida por fenilefrina no se modificó significativamente con TMB-8 10^{-6} M, pero las contracciones producidas por metoxamina se modificaron significativamente con esta concentración de TMB-8, e incluso aparecieron diferencias significativas cuando se administraban algunas dosis de metoxamina en presencia de TMB-8 10^{-6} M. La concentración 10^{-6} M de TMB-8 modificó significativamente la respuesta de todas las dosis de ambos agonistas (Tablas 31 y 32 págs. 156 y 158, Figuras 38 y 39 págs. 157 y 159).

TABLA 31

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE TMB-8.

METOXAMINA (M)	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8		
		10^{-4}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	10^{-3}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	10^{-2}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-6}	66.5 ± 6.1	49.6 ± 6.8	51.4 ± 10.2	$0.4 \pm 0.3^{***}$
3×10^{-6}	104.9 ± 5.8	93.6 ± 4.3	$87.1 \pm 5.5^*$	$10.7 \pm 4.0^{***}$
10^{-5}	131.5 ± 4.5	119.1 ± 3.7	$115.0 \pm 5.6^*$	$49.6 \pm 3.4^{***}$
3×10^{-5}	145.1 ± 4.4	$130.3 \pm 3.2^*$	$123.6 \pm 5.9^*$	$79.6 \pm 4.4^{***}$
10^{-4}	149.5 ± 4.1	$137.6 \pm 3.1^*$	$127.2 \pm 6.5^*$	$100.7 \pm 3.1^{***}$
3×10^{-4}	150.6 ± 4.1	138.9 ± 3.5	$128.4 \pm 6.7^*$	$106.1 \pm 2.4^{***}$

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

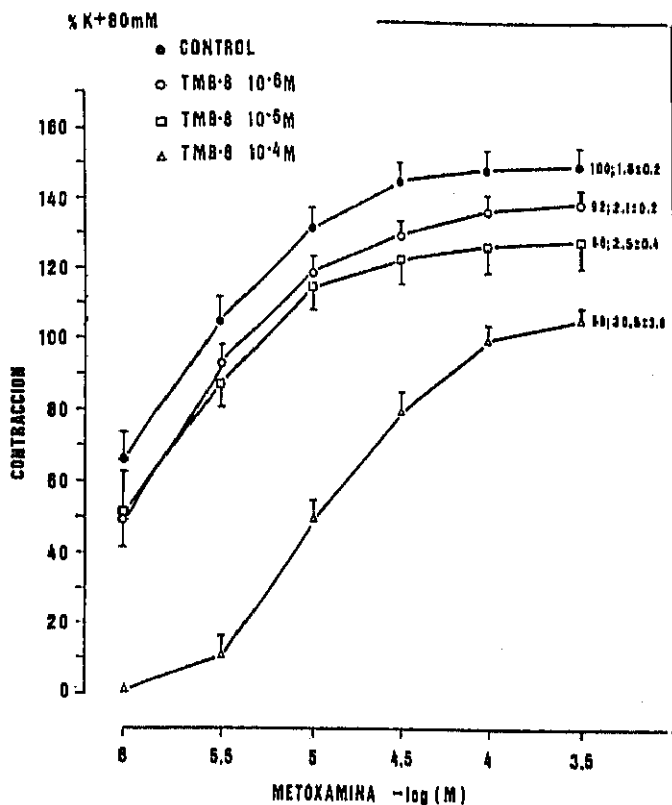


FIGURA 38.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de metoxamina en anillos de aorta de conejo. Control (●), y en presencia de distintas concentraciones de TMB-8 : $10^{-6}M$ (○), $10^{-5}M$ (□) y $10^{-4}M$ (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($10^{-4}M$).

TABLA 32

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE TMB-B.

FENILEFRINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-B	
		10^{-3}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	10^{-4}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-7}	51.0 ± 5.4	36.3 ± 7.9	$1.9 \pm 0.6^{***}$
3×10^{-7}	91.4 ± 6.4	84.5 ± 5.7	$12.4 \pm 12.5^{***}$
10^{-6}	117.1 ± 6.0	120.0 ± 4.9	$41.0 \pm 3.5^{***}$
3×10^{-6}	135.4 ± 4.0	134.4 ± 4.0	$59.4 \pm 3.9^{***}$
10^{-5}	143.8 ± 3.8	145.4 ± 3.6	$75.3 \pm 5.1^{***}$
3×10^{-5}	146.2 ± 3.6	150.1 ± 4.6	$85.8 \pm 3.6^{***}$

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

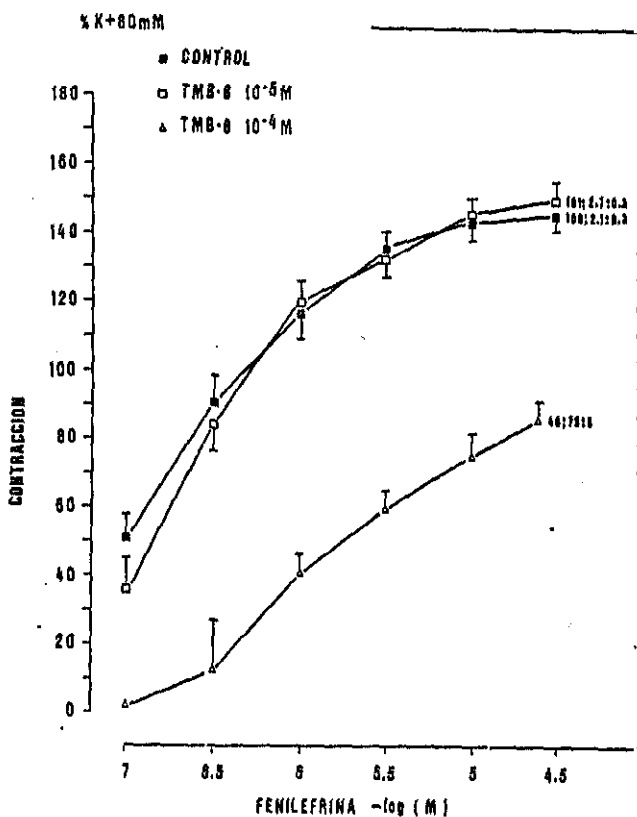


FIGURA 39.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de fenilefrina en anillos de aorta de conejo. Control (■), y en presencia de distintas concentraciones de TMB-8: 10^{-5} M (□) y 10^{-6} M (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (10^{-7} M).

Las respuestas de metoxamina y fenilefrina en preparaciones de anillos de aorta de conejo incubadas con TMB-8 10^{-8} M y nifedipina 10^{-6} M, fueron menores que las correspondientes respuestas en preparaciones que se habían incubado únicamente con nifedipina 10^{-6} M, o únicamente con TMB-8 10^{-8} . Con metoxamina la significación estadística de la diferencia con el control fue mayor en preparaciones incubadas con ambos fármacos, existiendo además diferencia significativa entre la respuesta de preparaciones incubadas solo con nifedipina y la respuesta de preparaciones incubadas con nifedipina y TMB-8, para las concentraciones más bajas de metoxamina. Con fenilefrina recordemos que no había inhibición significativa de su efecto ni en preparaciones incubadas con nifedipina 10^{-6} M, ni en preparaciones incubadas con TMB-8 10^{-8} M. Sin embargo, las preparaciones incubadas con ambos fármacos (nifedipina 10^{-6} M y TMB-8 10^{-8} M), mostraron menor contracción que las preparaciones control, existiendo en este caso diferencia significativa para todas las concentraciones de fenilefrina utilizadas. La contracción producida por las concentraciones más bajas de fenilefrina presentó además diferencia significativa con la contracción producida al administrar esas dosis en presencia únicamente de nifedipina (Tablas 33 y 34 pág. 161 y Tablas 35 y 36 pág. 163, Figuras 40 y 41 págs 162 y 164).

TABLA 33

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE TMB-8 Y NIFEDIPINA.

METOXAMINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 10^{-8}M + NIFEDIPINA 10^{-6}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-6}	66.5 \pm 6.1	21.2 \pm 5.8***
3×10^{-6}	104.9 \pm 5.8	60.0 \pm 5.4***
10^{-5}	131.5 \pm 4.5	91.2 \pm 4.4***
3×10^{-5}	145.1 \pm 4.4	111.2 \pm 3.2***
10^{-4}	149.5 \pm 4.1	120.2 \pm 5.2***
3×10^{-4}	150.6 \pm 4.1	122.9 \pm 4.3***

TABLA 34

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE TMB-8 Y NIFEDIPINA.

METOXAMINA [M]	CONTROL CON NIFEDIPINA 10^{-6}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 10^{-8}M + NIFEDIPINA 10^{-6}M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-6}	66.0 \pm 6.1	21.2 \pm 5.8***
3×10^{-6}	95.0 \pm 4.4	60.0 \pm 5.4***
10^{-5}	113.0 \pm 4.1	91.2 \pm 4.4**
3×10^{-5}	119.5 \pm 3.7	111.2 \pm 3.2
10^{-4}	121.2 \pm 3.7	120.2 \pm 5.2
3×10^{-4}	121.2 \pm 3.7	122.9 \pm 4.3

En ambas tablas las contracciones se valoran considerando el 100% la altura de las respuestas de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

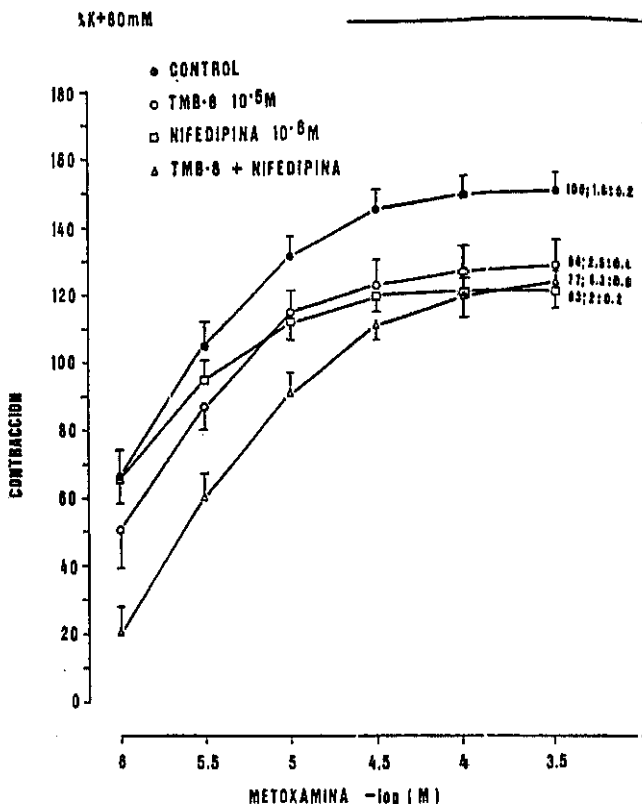


FIGURA 40.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de metoxamina en anillos de aorta de conejo. Control (●), en presencia de TMB-8 $10^{-6}M$ (○), en presencia de nifedipina $10^{-6}M$ (□) y en presencia de TMB-8 $10^{-6}M$ con nifedipina $10^{-6}M$ (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($10^{-6}M$).

TABLA 35

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE TMB-8 Y NIFEDIPINA.

FENILEFRINA [M]	CONTROL $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 10 ⁻⁸ M NIFEDIPINA 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10 ⁻⁷	51.0 ± 5.4	11.5 ± 0.8***
3 x 10 ⁻⁷	91.4 ± 6.4	48.6 ± 3.6***
10 ⁻⁶	117.1 ± 6.0	83.4 ± 5.4***
3 x 10 ⁻⁶	135.4 ± 4.4	102.8 ± 6.1***
10 ⁻⁵	143.8 ± 3.6	117.0 ± 6.7**
3 x 10 ⁻⁵	146.2 ± 2.7	123.5 ± 7.3*

TABLA 36

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE TMB-8 Y NIFEDIPINA.

FENILEFRINA [M]	CONTROL CON NIFEDIPINA 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$	TMB-8 10 ⁻⁸ M NIFEDIPINA 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10 ⁻⁷	36.1 ± 4.7	11.5 ± 0.8***
3 x 10 ⁻⁷	78.1 ± 3.7	48.6 ± 3.6***
10 ⁻⁶	104.5 ± 4.6	83.4 ± 5.4*
3 x 10 ⁻⁶	124.8 ± 6.6	102.8 ± 6.1*
10 ⁻⁵	138.8 ± 8.1	117.0 ± 6.7
3 x 10 ⁻⁵	142.1 ± 8.5	123.5 ± 7.3

En ambas tablas las contracciones se valoran considerando el 100% la altura de las respuestas de CIK 80 mM.

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

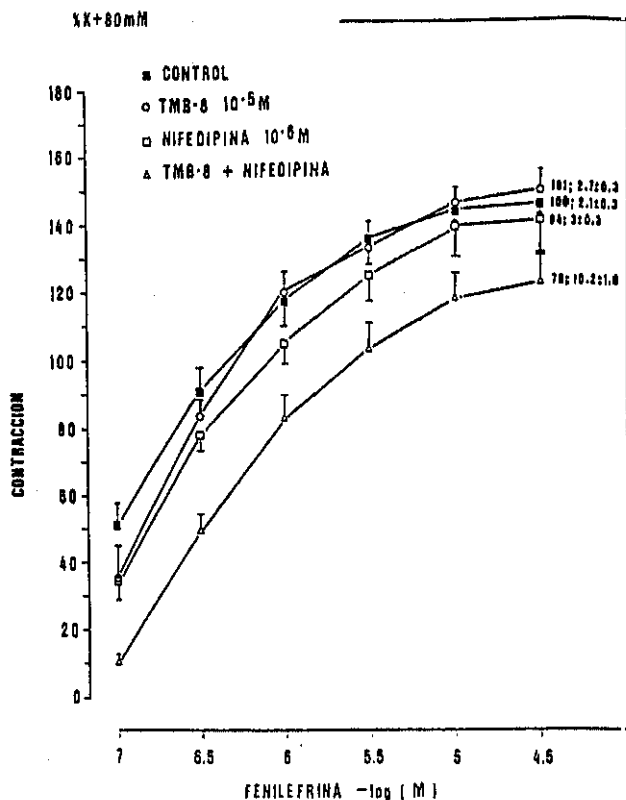


FIGURA 41.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de fenilefrina en anillos de aorta de conejo. Control (■), en presencia de TMB-8 $10^{-5}M$ (○), en presencia de nifedipina $10^{-6}M$ (□) y en presencia de TMB-8 $10^{-5}M$ con nifedipina $10^{-6}M$ (▲). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($10^{-7}M$).

Cuando se trabajó en líquido nutritivo hiperpotásico (K^+ 15 mM) pudimos comprobar que la metoxamina contraía en mayor grado la preparación de anillos de aorta de conejo, existiendo diferencia significativa con la contracción control obtenida en Krebs Henseleith (K^+ 5.9 mM) (Tabla 37 y 38 pág. 166, Figura 42 pág. 167). Si las preparaciones se incubaban con nifedipina $10^{-6}M$ la contracción resultaba menor, volviendo a obtenerse una contracción próxima al control (Tabla 38 pág. 166, Figura 42 pág. 167).

Contrastando con lo sucedido al administrar metoxamina, la contracción de fenilefrina en medio nutritivo hiperpotásico no presentó diferencia con el control (Tablas 39 pág. 168, Figura 43 pág. 169).

TABLA 37

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN LIQUIDO HIPERPOTASICO.

METOXAMINA [M]	CONTROL (CIK 5.9 mM) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	LIQUIDO HIPERPOTASICO (CIK 15 mM) $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10 ⁻⁶	66.5 ± 6.1	88.8 ± 6.1*
3 x 10 ⁻⁶	104.9 ± 5.8	129.6 ± 7.2*
10 ⁻⁵	131.5 ± 4.5	151.6 ± 5.6*
3 x 10 ⁻⁵	145.1 ± 4.4	160.7 ± 5.0*
10 ⁻⁴	149.5 ± 4.1	165.5 ± 4.5*
3 x 10 ⁻⁴	150.6 ± 4.1	166.8 ± 4.5*

TABLA 38

CONTRACCION DE METOXAMINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN LIQUIDO HIPERPOTASICO Y NIFEDIPINA.

METOXAMINA [M]	CONTROL CON LIQUIDO HIPERPOTASICO $\bar{x} \pm \text{ESM}$	LIQUIDO HIPERPOTASICO + NIFEDIPINA 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10 ⁻⁶	88.8 ± 6.1	66.6 ± 4.5*
3 x 10 ⁻⁶	129.6 ± 7.2	100.7 ± 4.8**
10 ⁻⁵	151.6 ± 5.6	125.4 ± 7.2*
3 x 10 ⁻⁵	160.7 ± 5.0	134.6 ± 7.1*
10 ⁻⁴	165.5 ± 4.5	139.9 ± 7.9*
3 x 10 ⁻⁴	166.8 ± 4.5	142.1 ± 8.4*

En ambas tablas las contracciones se valoran considerando el 100% la altura de las respuestas de CIK 80 mM.

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

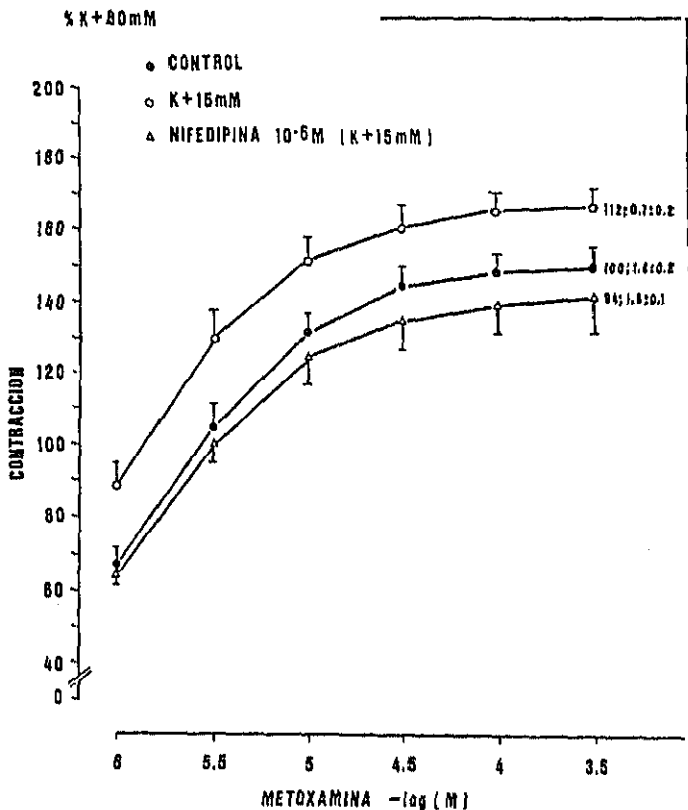


FIGURA 42.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de metoprolol en anillos de aorta de conejo. Control (●), en líquido hiperpotásico (CIK 15 mM) (○), y en líquido hiperpotásico en presencia de nifedipina 10^{-6} M (△). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM. Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (10^{-6} M).

TABLA 39

CONTRACCION DE FENILEFRINA EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN LIQUIDO HIPERPOTASICO.

FENILEFRINA [M]	CONTROL (CIK 5.9 mM) $\bar{x} \pm \text{ESM}$	LIQUIDO HIPERPOTASICO (CIK 15 mM) $\bar{x} \pm \text{ESM}$
10^{-7}	51.0 \pm 5.4	64.1 \pm 5.0
3×10^{-7}	91.4 \pm 6.4	103.9 \pm 4.3
10^{-6}	117.1 \pm 6.0	128.9 \pm 5.3
3×10^{-6}	135.4 \pm 4.4	137.9 \pm 5.8
10^{-5}	143.8 \pm 3.6	143.2 \pm 6.9
3×10^{-5}	146.2 \pm 2.7	143.8 \pm 7.1

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

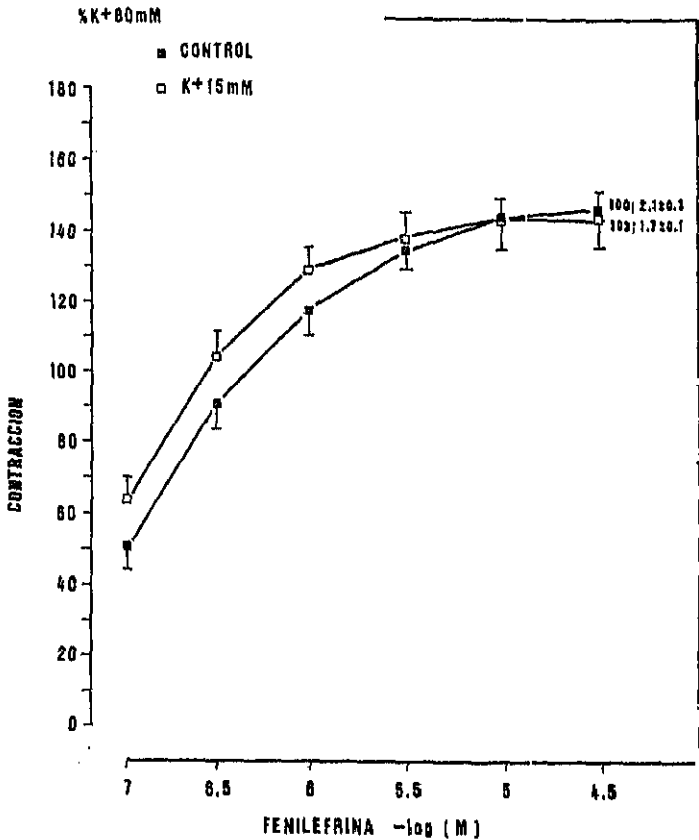


FIGURA 43.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de fenilefrina en anillos de aorta de conejo. Control (■), en líquido hiperpotásico (ClK 15 mM) (□). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} ($10^7 M$).

C) Ensayos con $Ag\alpha_2$ selectivos.-

Los $Ag\alpha_2$ contrajeron en forma dosis dependiente la preparación de anillos de aorta de conejo; sin embargo la altura de la contracción conseguida con dosis similares fue mucho menor que la de los $Ag\alpha_1$. Es decir, B-HT 920 y B-HT 933 mostraron menor potencia que metoxamina y fenilefrina para contraer la preparación de anillos de aorta de conejo.

El compuesto B-HT 920 empezó a producir contracción apreciable con la concentración $3 \times 10^{-6}M$, mientras que el compuesto B-HT 933 sólo empezó a contraer las preparaciones con la concentración $10^{-4}M$.

La contracción producida por B-HT 920 y B-HT 933 se inhibió totalmente cuando las preparaciones se incubaban con prazosin $10^{-6}M$, y por el contrario la actividad contráctil de ambos agonistas se potenció en preparaciones incubadas con BAY K 8644 $10^{-6}M$, apareciendo contracciones con dosis más bajas (Tablas 40 y 41 págs. 171 y 173, Figuras 44 y 45 págs. 172 y 174).

El efecto contráctil en presencia de BAY K 8644 era menor si las preparaciones se habían incubado con yohimbina $10^{-6}M$. Si comparamos los ensayos de los $Ag\alpha_2$ en presencia de BAY K 8644 $10^{-6}M$ y los ensayos similares también con BAY K 8644 en los que se llevó a cabo una incubación con yohimbina, se pudo apreciar diferencia significativa entre las contracciones producidas por las concentraciones $10^{-6}M$ ($p < 0.01$) y $3 \times 10^{-6}M$ ($p < 0.001$) de B-HT 920, y también se apreció diferencia estadística. entre las contracciones producidas por B-HT 933 $10^{-4}M$ ($p < 0.05$) (Tablas 40 y 41 págs. 171 y 173, Figuras 44 y 45 págs. 172 y 174).

TABLA 40

CONTRACCION DE B-HT 920 EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE BAY K 8644 Y YOHIMBINA.

B-HT 920 [M]	CONTROL $\bar{x} \pm ESM$	BAY K 8644 $10^{-6}M$ $\bar{x} \pm ESM$	YOHIMBINA $10^{-3}M$ + BAY K 8644 $10^{-6}M$ $\bar{x} \pm ESM$
10^{-6}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
3×10^{-6}	0.0 ± 0.0	$5.5 \pm 1.6^{**}$	$4.6 \pm 2.1^*$
10^{-5}	0.6 ± 0.3	$33.9 \pm 5.3^{***}$	$11.9 \pm 2.2^{***}$
3×10^{-5}	3.8 ± 0.9	$59.4 \pm 4.4^{***}$	$36.9 \pm 2.6^{***}$
10^{-4}	21.3 ± 2.6	$78.6 \pm 3.8^{***}$	$70.5 \pm 4.2^{***}$
3×10^{-4}	37.1 ± 2.5	$83.5 \pm 3.9^{***}$	$91.3 \pm 3.8^{***}$

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

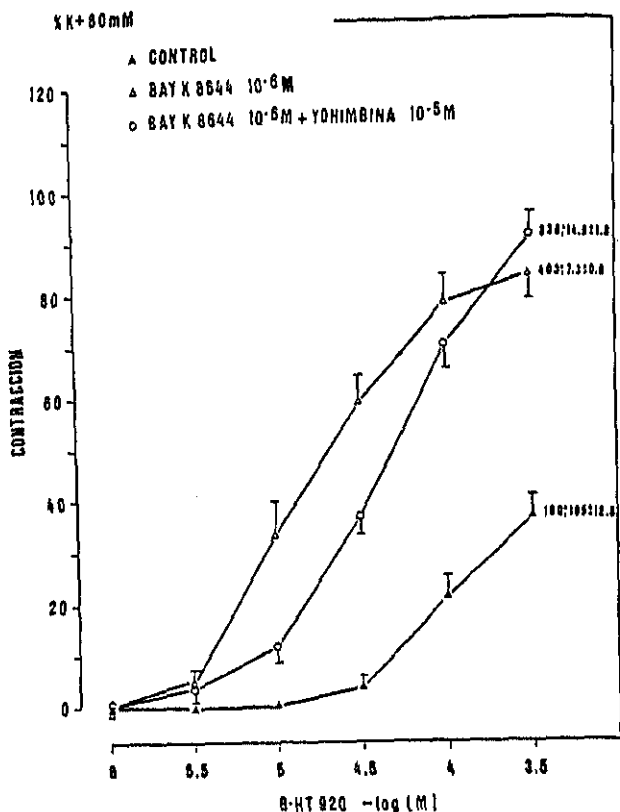


FIGURA 44.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de B-HT 920 en anillos de aorta de conejo. Control (▲), en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M (△) y en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M con yohimbina 10^{-5} M (○). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de ClK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (10^{-4} M).

TABLA 41

CONTRACCION DE B-HT 933 EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO EN PRESENCIA DE BAY K 8644 Y YOHIMBINA.

B-HT 933 [M]	CONTROL $\bar{x} \pm ESM$	BAY K 8644 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm ESM$	YOHIMBINA 10 ⁻⁵ M + BAY K 8644 10 ⁻⁶ M $\bar{x} \pm ESM$
10 ⁻⁶	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3 x 10 ⁻⁶	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10 ⁻⁵	0.0 ± 0.0	7.8 ± 4.0	0.0 ± 0.0
3 x 10 ⁻⁵	0.4 ± 0.2	31.0 ± 8.0**	14.6 ± 3.2***
10 ⁻⁴	5.3 ± 1.4	53.9 ± 6.8***	39.6 ± 5.8***
3 x 10 ⁻⁴	16.6 ± 3.6	74.7 ± 5.3***	57.6 ± 6.0***

La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CLK 80 mM.

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-9 ensayos.

*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

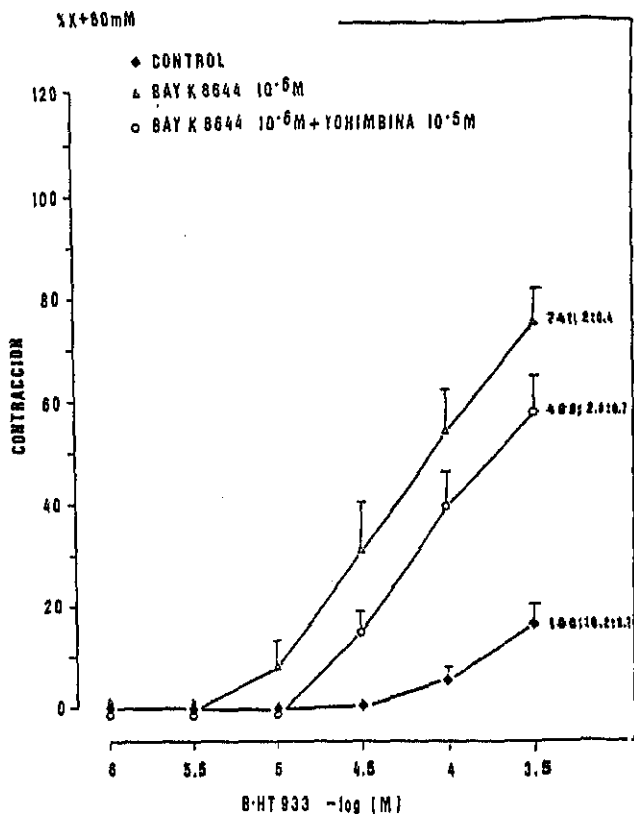
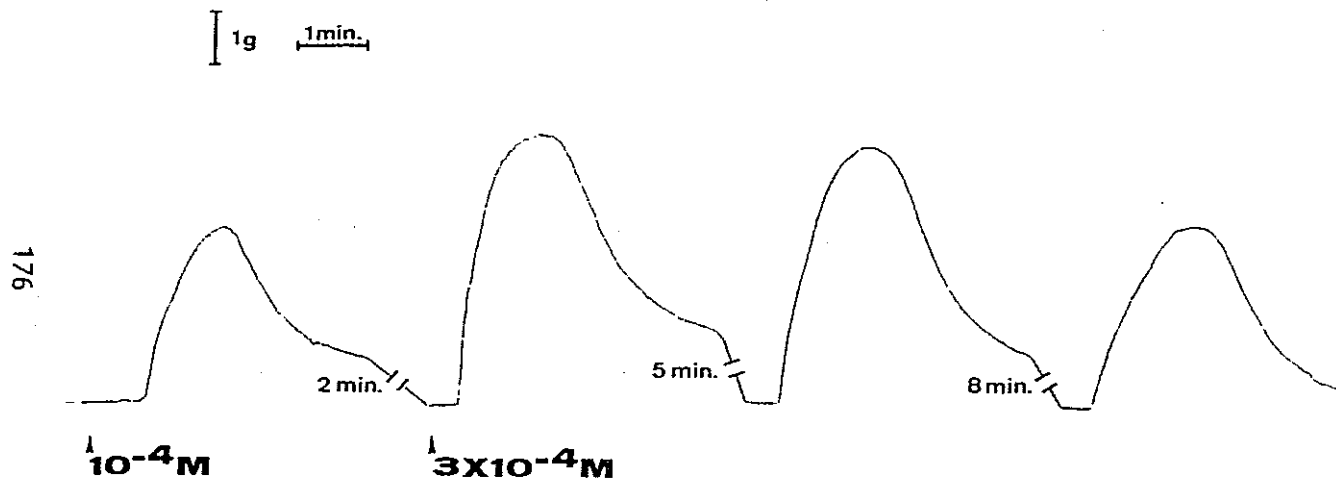


FIGURA 45.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas de la contracción de B-HT 933 en anillos de aorta de conejo. Control (◆), en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M (▲) y en presencia de BAY K 8644 10^{-6} M con yohimbina 10^{-5} M (○). La contracción se valora considerando el 100% la altura de la respuesta de CIK 80 mM. Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos. El primer número a la derecha de cada curva representa el área bajo esa curva (área bajo la curva control = 100%), y el segundo número es la correspondiente DE_{50} (10^{-6} M).

El compuesto B-HT 920 en presencia de BAY K 8644 $10^{-6}M$ fue capaz de contraer incluso las preparaciones incubadas con prazosín $10^{-6}M$ ($n=9$); pero el compuesto B-HT 933 no fue capaz de producir contracciones en presencia de BAY K 8644 si las preparaciones se incubaban con prazosín $10^{-6}M$ ($n=7$). Después de la administración de dosis iguales o mayores de $10^{-6}M$ de B-HT 920 en estas condiciones, se producen en realidad varias contracciones fásicas. Es decir, la contracción producida con B-HT 920 en las preparaciones incubadas con BAY K 8644 y prazosín no fue una contracción mantenida, volviendo a recuperar la preparación niveles de tono próximos al basal pocos minutos después de contraerse, pero después de cada administración este tipo de contracción se repite varias veces sucesivas, aunque cada vez con mayor margen de tiempo y menor altura. Con la concentración $10^{-6}M$ del compuesto B-HT 920 la altura máxima alcanzada (altura de la primera contracción después de la administración) osciló entre 1 y 3 g. aproximadamente, y con la concentración $3 \times 10^{-6}M$ de este compuesto la altura máxima alcanzada osciló entre 3 y 5 g. Podríamos por tanto decir que el efecto de B-HT 920 en estas condiciones fue dosis-dependiente. (Figura 46 pág. 176). Este tipo de respuesta contráctil no apareció si las preparaciones además de incubarse con prazosín $10^{-6}M$ y BAY Y K 8644 $10^{-6}M$, se incubaban también con yohimbina $10^{-6}M$ ($n=7$).

EN PRESENCIA DE PRAZOSIN $10^{-5}M$ Y BAY K 8644 $10^{-6}M$



B-HT 920

FIGURA 46.- Registro de las contracciones de B-HT 920 en una preparación de anillos de aorta de conejo en presencia de prazosin $10^{-5}M$ y BAY K 8644 $10^{-6}M$.

En la Tabla 42 se presenta la relación entre la DE_{50} de cada agonista α en las distintas condiciones experimentales y su DE_{50} control en anillos de aorta de conejo.

TABLA 42

	METOXAMINA	FENILEFRINA	B-HT 920	B-HT 933
NIFEDIPINA $10^{-4}M$ -----	1.09 ± 0.10	1.42 ± 0.13	----	----
BAY K 8644 $10^{-4}M$ -----	0.49 ± 0.05	0.80 ± 0.07	0.07 ± 0.0	0.10 ± 0.0
LIQUIDO HIPERPOTASICO (15 mM K^+) -----	0.39 ± 0.10	0.82 ± 0.07	----	----
LIQUIDO HIPERPOTASICO (15 mM K^+) } NIFEDIPINA $10^{-4}M$ } -----	0.63 ± 0.31	----	----	----
SIN CALCIO } EGTA 0.5 mM } -----	∞	∞	----	----
TMB-8 $10^{-4}M$ -----	1.16 ± 1.12	----	----	----
TMB-8 $10^{-4}M$ -----	1.41 ± 0.21	1.27 ± 0.11	----	----
TMB-8 $10^{-4}M$ -----	16.95 ± 2.11	35.7 ± 23	----	----
TMB-8 $10^{-4}M$ } NIFEDIPINA $10^{-4}M$ } -----	3.52 ± 0.44	4.85 ± 0.46	----	----
BAY K 8644 $10^{-4}M$ } YOHIMBINA $10^{-4}M$ } -----	----	----	0.14 ± 0.0	0.15 ± 0.0

La relación se obtiene del cociente DE_{50} del agonista en unas condiciones de trabajo / DE_{50} del agonista en condiciones control.

La DE_{50} se estima como la dosis capaz de producir el 50% del efecto máximo obtenido en condiciones control.

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 7-9 ensayos.

4.- DISCUSSION

4.1.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN "PITHED-RAT".

En esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un trabajo paralelo en "pithed-rat" y en anillos de aorta de conejo con $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$. Se han utilizado AnCa y AgCa para estudiar la participación del Ca^{++} en las respuestas vasculares de ambos agonistas adrenérgicos. Antes de abordar la Discusión de los resultados obtenidos con $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat", queremos justificar el procedimiento utilizado para la administración de nifedipina y BAY K 8644 en los ensayos de "pithed-rat". Como ya hemos señalado en el apartado 2.2 de Material y Métodos, estos fármacos se administraron por vía ia., utilizando un catéter introducido en la carótida izquierda hasta alcanzar el cayado de la aorta. Su administración en el cayado de la aorta permite el acceso de nifedipina y BAY K 8644 a la circulación sistémica, evitando así posibles efectos cardiotóxicos directos. Tanto nifedipina como BAY K 8644, son dihidropiridinas (DHP) con selectividad vascular, pero sin embargo, los ensayos llevados a cabo al comenzar esta Tesis Doctoral (presentados en el apartado 3.1.A de Resultados), mostraron que su efecto sobre la presión arterial es mayor cuando se administran iv, en la yugular, que cuando se administran por vía ia. Esto pudiera ser debido a un efecto adicional inotrópico negativo para la nifedipina, e inotrópico positivo para el BAY K 8644, que se pondría de manifiesto junto con el efecto vasodilatador o vasoconstrictor en las administraciones iv. Otros autores también han utilizado la administración ia. para las DHP cuando trabajaban en "pithed-rat"; en unos casos usando la arteria femoral (Jim y col. 1986), y en otros casos la arteria carótida (Van Meel y col. 1983; Wilffert y col. 1984 a y b; Timmermans y col. 1985, 1987 a y b; Nichols y Ruffolo 1986; Timmermans y Thoolen 1987). Además, cuando se trabaja en "pithed-rat" podemos señalar que los efectos vasculares no producirán efectos reflejos cardíacos, debido a la destrucción que se lleva a cabo del bulbo y la médula en esta preparación. Por otra parte, la nifedipina se señaló en el apartado 3.1.A de esta Tesis Doctoral, que únicamente ocasionaba disminución de la PSD apreciable en ratas que mostraban una tensión diastólica inicial alta. Esta relación entre el efecto de nifedipina y el tono presor preexistente, se ha descrito precisamente como una ventaja adicional para la utilización de este fármaco como hipotensor (Bühler y col. 1984; Romero y col. 1987; Blackshear y col. 1987; Nayler 1988; Walley y col. 1988; Fuji y col. 1988; Rullope y col. 1989; Rullope 1990). Su efecto podría en realidad

considerarse más un efecto antihipertensivo que un efecto hipotensor, ya que los pacientes con el tono vascular más elevado mostrarían mayor sensibilidad. La nifedipina de este modo normalizaría la presión arterial sin presentar los problemas y efectos secundarios de otros tratamientos utilizados en la hipertensión. En lo que respecta a los efectos presores de BAY K 8644, estos serían sobre todo el resultado de la activación directa de las células de músculo liso vascular por aumento de la entrada de Ca^{++}_{ext} a través de canales VOC. Este mecanismo hipertensor en ratas ya fue señalado por Lefer y col. (1988), pero sin embargo algunos autores (Moreland y col. 1988) señalan que los efectos presores de BAY K 8644 en ratas podrían ser también el resultado de una activación indirecta de las células de músculo liso vascular por la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal. Este mecanismo de acción sería sin embargo mucho menos significativo.

Pasamos ahora a comentar los resultados con $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat". La existencia simultánea de receptores α_1 y α_2 postsinápticos en el músculo liso vascular se conoce hace tiempo (Starke 1981; Timmermans y Van Zwieten 1981, 1982; McGrath 1982). Como ya señalamos en el apartado 1.5 de la introducción, el subtipo de adrenoceptor α queda definido sobre todo por los fármacos capaces de unirse a él, pudiendo variar en distintos órganos la localización pre o postsináptica de los receptores α_2 . Estos receptores α_2 aparecen a nivel postsináptico en el músculo liso vascular, y su estímulo produce, al igual que el estímulo de receptores α_1 postsinápticos, un aumento de tono vascular que se traduce en un incremento presor en "pithed-rat". Comentaremos primeramente los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con $Ag \alpha_2$, ya que el efecto de estos fármacos fue más sensible a las modificaciones de la entrada del Ca^{++}_{ext} que el efecto de los $Ag \alpha_1$. Para comparar el efecto de distintos tratamientos se utiliza fundamentalmente el valor del área bajo la curva dosis-respuesta, y se ha obtenido también el valor de la DE_{50} que como ya señalamos en el apartado 2.6 de Material y Métodos, se define como la dosis capaz de elevar la PSD 50 mm Hg. Es usual esta definición de la DE_{50} en los ensayos de "pithed-rat", y ello es debido a la frecuente muerte de los animales cuando se administran dosis elevadas de fármacos vasopresores, no consiguiéndose obtener efectos que definan la meseta y por tanto el efecto máximo, en las curvas dosis-respuesta. La importancia que tiene la entrada de Ca^{++}_{ext} al interior celular para el efecto vasoconstrictor es sobradamente conocida. Teniendo en cuenta la marcada

Inhibición de las respuestas de B-HT 920 y B-HT 933 en "pithed-rat" producidas por nifedipina (en las Figuras 26 y 27, págs. 116 y 118, vemos que no fue posible usualmente provocar elevaciones de 50 mm de Hg. en la presión sanguínea diastólica después del tratamiento con nifedipina, y se consiguió aproximadamente un 90% de reducción del área bajo la curva de ambos Ag α_2 con la concentración máxima de AnCa), podemos afirmar que la fuente de Ca^{++}_{int} es muy importante para las respuestas vasoconstrictoras por estímulo de receptores α_2 . Como hemos señalado en la Introducción, una de las principales vías de entrada del Ca^{++}_{int} a través de la membrana de la célula lisa vascular estaría vinculada a la despolarización de la membrana, y sería la entrada a través de canales VOC que pueden ser bloqueados selectivamente por nifedipina. De los resultados obtenidos, podríamos deducir que el estímulo de receptores α_2 pondría en marcha mecanismos de apertura de estos canales VOC, aunque tales mecanismos no han podido esclarecerse todavía probablemente debido a la dificultad para aplicar técnicas electrofisiológicas en músculo liso. El grupo de Timmermans y Van Zwieten puso también de manifiesto la marcada inhibición del efecto de los Ag α_2 en "pithed-rat" cuando se utilizaban AnCa, y en el momento actual se siguen realizando estudios con distintos Ag α_2 en "pithed-rat" que intentan esclarecer el mecanismo de su efecto vasopresor y la importancia que tiene el Ca^{++}_{int} en la vasoconstricción por estímulo de este tipo de receptores (Van Meel y col. 1981 a y b, 1982, 1983; Van Zwieten y col. 1982, 1984, 1985, 1987; Timmermans y col. 1983, 1984, 1987 b; Van Zwieten y Timmermans 1984; Wiffert y col. 1984 a y b; Van Zwieten 1986, 1989; Timmermans y Thoolen 1987; Hugtenburg y col. 1989; Van Heiningen y col. 1989; Wong y col. 1989 a y b, 1990). En cualquier caso no cabe duda que existen interacciones importantes entre la entrada del Ca^{++}_{int} por canales VOC, y las respuestas α_2 vasoconstrictoras.

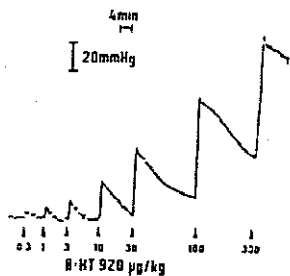
Los ensayos con el compuesto BAY K 8644 en esta Tesis Doctoral son una prueba adicional de la relación entre esta entrada del Ca^{++} por canales VOC, y el efecto vasoconstrictor α_2 en "pithed-rat". Esta dihidropiridina ya señalamos en el apartado 1.3 de la Introducción, que es capaz de promover la entrada de Ca^{++}_{int} por canales VOC. Su administración la en "pithed-rat" causó efectos opuestos a los de nifedipina sobre las respuestas α_2 vasoconstrictoras. Las Figuras 28 y 29, págs. 121 y 123, mostraron los desplazamientos de las curvas dosis-respuesta de

B-HT 920 y B-HT 933 por BAY K 8644. En este caso tuvo lugar un desplazamiento hacia la izquierda, consiguiéndose una reducción de la dosis necesaria para elevar la PSD 50 mm de Hg., y obteniéndose mayores áreas bajo las curvas de los Ag α_2 . BAY K 8644 incrementa el efecto α_2 promoviendo la entrada de Ca^{++} por canales VOC sin interaccionar con los receptores α_2 vasculares.

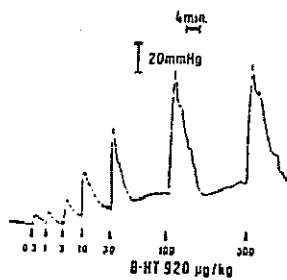
Las Figuras 47 y 48, págs. 182, 183 reúnen los registros más significativos de Ag α_2 presentados en nuestros resultados. En ellas se puede apreciar la variación de los incrementos presores producidos con B-HT 920 y B-HT 933 después del tratamiento la. con distintas concentraciones de nifedipina y de BAY K 8644.

Resulta sobre todo llamativa la disminución del efecto causada por nifedipina.

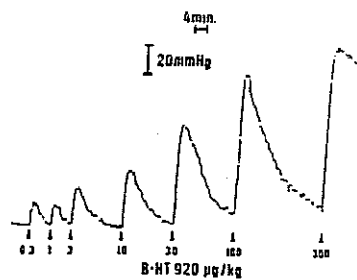
*CONTROL



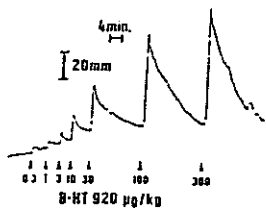
*BAY K 8644 100 µg/kg



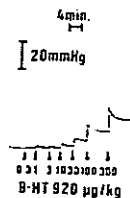
*BAY K 8644 300 µg/kg



*NIFEDIPINA 100 µg/kg



*NIFEDIPINA 300 µg/kg

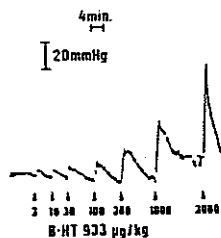


*NIFEDIPINA 1000 µg/kg

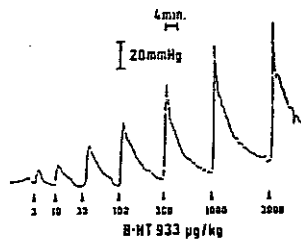


FIGURA 47.- Registros del incremento de la presión sanguínea diastólica en "pilthed-rat" por la administración de B-HT 920. Tratamiento (*).

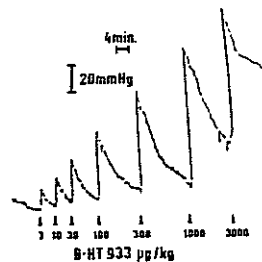
*CONTROL



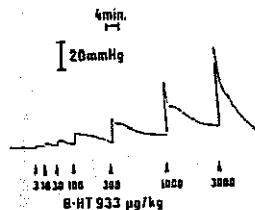
*BAY K 8644 100 µg/kg



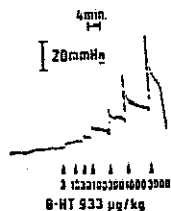
*BAY K 8644 300 µg/kg



*NIFEDIPINA 100 µg/kg



*NIFEDIPINA 300 µg/kg



*NIFEDIPINA 1000 µg/kg

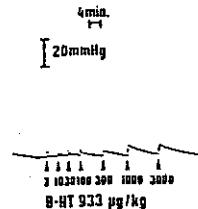


FIGURA 48.- Registros del incremento de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por la administración de B-HT 933. Tratamiento (*).

El efecto vasopresor mediado por estímulo de receptores α_1 en "pithed-rat", fue desde luego menos sensible al bloqueo de la entrada del Ca^{++}_{ext} que el efecto vasopresor mediado por estímulo de receptores α_2 . Las Figuras 20 y 21, págs. 101 y 103, mostraron los desplazamientos de las curvas dosis-respuesta de metoxamina y fenilefrina, producidos por el tratamiento con distintas dosis de nifedipina. La nifedipina también se comportó en este caso como antagonista no competitivo, produciendo aplanamientos de las curvas dosis-respuesta de los Ag α_1 , pero produjo una inhibición del área bajo la curva siempre inferior al 45%, con aumentos mucho menos acusados en las DE_{50} que los producidos para los Ag α_2 . BAY K 8644 potenció el efecto de los Ag α_1 , resultando algo menor este potenciamiento que el potenciamiento logrado para Ag α_2 . En los tratamientos con BAY K 8644 las diferencias entre ambos tipos de agonistas no fueron desde luego tan marcadas como en el caso de los tratamientos con nifedipina.

Los experimentos de otros investigadores con Ag α_1 y AnCa en "pithed-rat" han presentado hasta la fecha resultados dispares, que en parte estaban condicionados por el tipo de Ag α_1 utilizado. El grupo de Van Zwieten y Timmermans (Timmermans y col. 1983 b; Van Zwieten y col. 1985; Timmermans y col. 1987 a,b), comprobó que en "pithed-rat" la vasoconstricción inducida por un número elevado de Ag α_1 , entre los que se encontraban metoxamina y fenilefrina, era resistente a la inhibición de la entrada del Ca^{++}_{ext} por AnCa. Estos datos contrastan con los obtenidos en esta Tesis Doctoral con los mismos agonistas. Sin embargo hay que señalar que el grupo recién mencionado (Timmermans y col. 1983 b, c; Mathy y col. 1983), había comprobado que la vasoconstricción inducida por Ag α_1 selectivos imidazolínicos, disminuía significativamente por el pretratamiento con AnCa. En particular, el compuesto Sgd 101/75 [2-(methylindazol-4-ilmino) imidazolina HCl], que es un agonista selectivo pero parcial de receptores α_1 , ocasionó respuestas vasoconstrictoras en ratas y gatos desmedulados ("pithed") que resultaban marcadamente sensibles a la inhibición de la entrada del Ca^{++}_{ext} con nifedipina. Los Ag α_1 insensibles al bloqueo de los canales VOC eran compuestos con mayor actividad intrínseca, y se les consideró "agonistas totales"; y aquellos fármacos Ag α_1 que eran sensibles a los AnCa se les consideró "agonistas parciales".

La diferente sensibilidad al bloqueo de los canales VOC entre Ag α_1 y Ag α_2 se ha justificado de distintas formas por los diferentes grupos investigadores, pero

en cualquier caso los mecanismos implicados en la vasoconstricción por Ag α_1 parciales podrían ser próximos a los mecanismos implicados en la vasoconstricción por estímulo α_2 .

Para justificar la insensibilidad al bloqueo de la entrada del Ca^{++} por canales VOC de los Ag α_1 , se ha especulado que podrían existir receptores α_1 de reserva. Estos receptores α_1 de reserva entrarían en juego cuando se administran los AnCa, y servirían para amortiguar su efecto (Reid y col. 1983; Hamilton y col. 1983; Ruffolo y Yaden 1984; Ruffolo y col. 1984). En la circulación arterial podrían existir una gran cantidad de receptores α_1 postsinápticos vasculares de reserva, pero no existirían sin embargo receptores α_2 postsinápticos de reserva. Se pudo además comprobar, que la eliminación de los supuestos receptores α_1 de reserva para el agonista total cirazolina, mediante tratamiento con el antagonista irreversible de adrenoceptores α fenoxibenzamina, hacía que las respuestas presoras de este Ag α_1 fuesen sensibles a los AnCa (Ruffolo y col. 1984). La resistencia de los Ag α_1 totales a la inhibición de su efecto por antagonistas no competitivos como los AnCa, podría ser consecuencia de la gran cantidad de receptores α_1 de reserva, pudiendo resultar estos Ag α_1 sensibles a estos antagonistas si los receptores α_1 de reserva se eliminan mediante su adecuado bloqueo.

En nuestros experimentos el efecto presor inducido en "pithed-rat" por metoxamina y fenilefrina fue significativamente menor después de tratamiento con nifedipina, pese a que en este caso los Ag α_1 fuesen derivados feniletilamina. Estos Ag α_1 no pertenecen al grupo de compuestos imidazolinicos caracterizados como agonistas parciales; serían agonistas totales derivados de la feniletilamina, y la existencia de receptores α_1 de reserva no debería descartarse. Los receptores α_1 de reserva para metoxamina y fenilefrina podrían ser al menos responsables de que las respuestas presoras con estos agonistas en "pithed-rat" hayan sido menos sensibles a los AnCa que las respuestas presoras de los Ag α_2 . Probablemente como consecuencia de la existencia de receptores α_1 de reserva existe siempre un efecto amortiguador del antagonismo no competitivo de fármacos como los AnCa; pero la cantidad de receptores de reserva y por tanto la amortiguación del antagonismo, puede ser distinta para diferentes Ag α_1 , siendo probablemente menor para los Ag α_1 imidazolinicos, y mayor para Ag α_1 como metoxamina o fenilefrina que tienen también mayor actividad intrínseca.

En cualquier caso, el o los procesos subsiguientes a la activación de receptores α_1 , no parecen implicar exclusivamente la entrada del $\text{Ca}^{++}_{\text{ext}}$, siendo por tanto el efecto de los Ag α_1 , poco sensible a la modificación de la entrada de $\text{Ca}^{++}_{\text{ext}}$ al interior celular. Los trabajos de Godfraind en aorta de rata con $^{45}\text{Ca}^{++}$ (Godfraind y Miller 1982; Godfraind y col. 1982) con ^{45}Ca ya hemos señalado en el apartado 1.6 de Introducción de esta Tesis Doctoral que resultaron decisivos, y establecieron que la estimulación de los receptores α_2 , podía abrir canales de calcio, pero la estimulación de receptores α_1 , inducía la liberación de iones Ca^{++} de los depósitos intracelulares. Como más tarde comentaremos los ensayos "in vitro" han ayudado a comprender la utilización del Ca^{++} en la vasoconstricción inducida por estímulo α_1 , y la fuente intracelular de Ca^{++} parece fundamental para el efecto vasoconstrictor de estos agonistas. Hemos señalado también en el apartado 1.6 de esta Tesis Doctoral, que Timmermans y col. trabajando en "pithed-rat" (1985) propusieron dos modalidades de interacción en los receptores α_1 , estando una vinculada a la utilización del $\text{Ca}^{++}_{\text{ext}}$, y la otra vinculada a la utilización del $\text{Ca}^{++}_{\text{int}}$. Para Han y col. en 1987, existirían en realidad dos subtipos de receptores α_1 , que como también indicamos en ese mismo apartado, causarían respuestas contráctiles a través de mecanismos moleculares diferentes. En realidad no todos los autores aceptan la existencia de receptores de reserva vasculares para los Ag α_1 , como causa de la insensibilidad del efecto presor de estos agonistas a los AnCa. El grupo de Timmermans (Timmermans y col. 1985), comprobó que el antagonista irreversible de receptores α benextramina, no aumentaba la potencia de nifedipina para bloquear las respuestas presoras de cirazolina. La fenoxibenzamina para estos autores no debía su efecto al bloqueo de receptores de reserva, sino que podía incrementar la sensibilidad de los Ag α_1 , al tratamiento con AnCa interfiriendo selectivamente con la utilización del Ca^{++} de los depósitos intracelulares.

Desde luego el mecanismo implicado en el efecto de fenoxibenzamina no ha podido esclarecerse totalmente. Para Nichols y Ruffolo el mecanismo seguiría siendo el bloqueo de receptores de reserva, ya que estos autores observaron (1986) que después del tratamiento con una concentración de benextramina, que inactiva aproximadamente la misma fracción de receptores α_1 , que la concentración utilizada de fenoxibenzamina, se conseguía también aumentar la sensibilidad de las respuestas presoras de cirazolina a la inhibición con nifedipina. Es decir, que

después de eliminar los receptores α_1 vasculares de reserva con concentraciones adecuadas de fenoxibenzamina o benextramina, las respuestas presoras de cirazolina resultarían sensibles al antagonismo con nifedipina. En 1988 Gonsalves y col. comprueban además que después del tratamiento con 1 mg/kg de fenoxibenzamina en "pithed-rat", y después del tratamiento con 3 mg/kg de fenoxibenzamina en perro anestesiado, las respuestas presoras de cirazolina y de fenilefrina son debidas fundamentalmente al estímulo de receptores α_2 , pudiéndose inhibir marcadamente con verapamil.

En cualquier caso, no todos los Ag α_1 se comportan igual, y de hecho no todos presentan igual sensibilidad a los tratamientos con fenoxibenzamina. Así en 1987 Timmermans y Thoolen encuentran que fenoxibenzamina puede no afectar el efecto de nifedipina sobre las respuestas presoras de Ag α_1 en "pithed-rat" si se trata de Ag α_1 parciales. Estos autores comprobaron que dobutamina y el compuesto BDF 6143 aumentaban la PSD en ratas desmeduladas y con bloqueo β -adrenérgico, comportándose como Ag α_1 , ya que sus respuestas presoras se afectaban marcadamente con prazosín (0.1 mg/kg iv.) y no se afectaban con yohimbina (1 mg/kg iv.). Estos compuestos eran sin embargo Ag α_1 parciales y la nifedipina se mostró capaz de bloquear su efecto presor con potencia igual a la que mostró para bloquear el efecto del Ag α_2 B-HT 920, no afectándose la potencia del bloqueo por el pretratamiento con fenoxibenzamina. Además el compuesto BAY K 8644 incrementó en este caso el efecto presor de los fármacos, sugiriendo estos autores que en el caso de dobutamina y BDF 6143 sus respuestas presoras dependían de la entrada de Ca^{++} en la misma medida que las respuestas presoras por estímulo α_2 . Por tanto el bloqueo de las respuestas presoras en "pithed-rat" por AnCa parece variar ampliamente para distintos Ag α_1 .

La utilización del Ca^{++} tras el estímulo α_1 podríamos pensar por todo lo antedicho que varía en función principalmente de 3 características: el subtipo de receptor que se activa, la eficacia (actividad intrínseca) del fármaco agonista, y la estructura química del mismo.

Considerando las teorías de los distintos grupos investigadores, así como nuestros resultados en "pithed-rat", podríamos arriesgarnos a pensar que aquellos Ag α_1 para los que existen más receptores de reserva son en realidad los Ag α_1 que utilizarían prioritariamente el Ca^{++} proveniente de los depósitos intracelulares

como fuente para la contracción vascular, resultando por tanto para ellos menos importante la entrada de Ca^{++}_{ext} al interior celular. Esto supondría que el estímulo de un $Ag \alpha_1$, con elevada actividad intrínseca promueve fundamentalmente la utilización de las reservas de Ca^{++}_{int} . La inhibición de la entrada de Ca^{++}_{ext} al interior celular no modificaría sustancialmente su efecto porque probablemente podrían estimularse receptores α_1 de reserva que incluso podrían estar vinculados también a la utilización del Ca^{++}_{int} . Si existiesen receptores α_1 de reserva para los $Ag \alpha_1$, parciales, estos receptores estarían al igual que los receptores α_2 vinculados en mayor grado a la utilización del Ca^{++}_{ext} . Es decir, que no solo podría variar la cantidad de receptores de reserva para los distintos $Ag \alpha_i$, sino que podrían existir también diferencias cualitativas y podríamos hablar de "subtipos de receptores de reserva".

Podríamos pensar que la vasoconstricción por estímulo α_1 es siempre consecuencia de la entrada del Ca^{++}_{ext} y de la liberación del Ca^{++} de los depósitos intracelulares. Ambas fuentes elevarían el nivel de Ca^{++}_{int} libre para que tuviese lugar el proceso contráctil. La participación proporcional de ambas fuentes de Ca^{++} podría ser sin embargo distinta dependiendo del agonista y de la preparación utilizada. La escasa participación del Ca^{++}_{ext} en la vasoconstricción α_1 , por metoxamina y fenilefrina, podría ser la causa de que el tratamiento con BAY K 8644 llevado a cabo en esta Tesis Doctoral potencie sólo levemente el efecto de estos agonistas en "pithed-rat".

Las diferencias en la sensibilidad al bloqueo de la entrada del Ca^{++}_{ext} con AnCa entre $Ag \alpha_2$ y $Ag \alpha_1$ se han seguido estudiando. Ha podido comprobarse con la preparación de "pithed-rat" que las respuestas vasopresoras del $Ag \alpha_2$, B-HT 933 también eran más sensibles a la inhibición por nifedipina que las respuestas vasopresoras del $Ag \alpha_1$, metoxamina, en distintos lechos vasculares (femoral y safena) (Medgett y Ruffolo 1988).

Aparte de las diferencias anteriormente mencionadas en la sensibilidad al tratamiento con nifedipina o BAY K 8644, ya dijimos en el apartado 3.1.C de Resultados, que el efecto vasopresor de los $Ag \alpha_1$, y el efecto vasopresor de los $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat", presenta algunas diferencias. Estas diferencias pensamos que también podrían explicarse en base a las distintas fuentes de Ca^{++} que podrían utilizar estos agonistas para contraer el músculo liso vascular. En el apartado 3.1.C

de Resultados señalamos que la elevación de la PSD era más rápida cuando se administran metoxamina o fenilefrina que cuando se administran B-HT 920 o B-HT 933. La demora en la respuesta de los $Ag \alpha_2$ pudo apreciarse en nuestros experimentos, pero la velocidad de papel utilizada para los registros presentados en esta Tesis Doctoral no permite sin embargo apreciar claramente esta diferencia. Además de esto, los efectos presores alcanzados en las curvas dosis-respuesta de B-HT 920 y B-HT 933 pudimos ver que eran menores que los efectos alcanzados por administración de $Ag \alpha_1$. Estas observaciones coinciden con las de diversos autores (Timmermans y Van Zwieten 1980; Van Meel y col. 1981 c). La liberación de Ca^{++} desde los depósitos intracelulares pensamos que podría jugar un papel importante en la rápida elevación de la presión arterial después del estímulo α_1 . Esta fuente de Ca^{++} junto con la entrada de Ca^{++}_{ext} suministraría los iones necesarios para la vasoconstricción, y sería importante sobre todo para la necesaria elevación inicial de los niveles de Ca^{++}_{libre} . Los depósitos intracelulares de Ca^{++} podrían jugar un papel prioritario en la vasoconstricción por estímulo α_1 , pero su agotamiento condicionaría un retorno también rápido a niveles basales de presión arterial. Es en realidad cierto que después del incremento presor por estímulo α_1 , la PSD comienza en seguida a disminuir, recuperando en poco tiempo los valores iniciales registrados antes de la administración, (como se mencionó en el apartado 3.1.B de Resultados). En el apartado 3.1.C de Resultados se señaló que los $Ag \alpha_2$ producían sin embargo vasoconstricciones más mantenidas. Los registros presores de $Ag \alpha_1$ y $Ag \alpha_2$ presentados en las páginas 125 a 140 de esta Tesis Doctoral muestran estas diferencias. En ellos puede apreciarse que con los $Ag \alpha_2$ (B-HT 920 y B-HT 933) la PSD no recupera usualmente el nivel que tenía antes de la administración. Esto sin embargo, únicamente ocurrió ocasionalmente con metoxamina o fenilefrina cuando se administraban las dosis más elevadas. La entrada continua del Ca^{++}_{ext} podría ser fundamental para el mantenimiento del tono presor por estímulo α_2 en "pithed-rat", pero la elevación inicial del Ca^{++}_{libre} necesaria para poner en marcha el mecanismo contráctil sería en este caso más lenta. El Ca^{++} de los depósitos intracelulares no se utilizaría prácticamente para la vasoconstricción por estímulo α_2 , y quizá por eso la elevación de la PSD sería más lenta y nunca tan acusada como en el caso de los $Ag \alpha_1$. Es decir que cuando se utiliza un $Ag \alpha_1$, los niveles de Ca^{++}_{libre} aumentarían bruscamente por la liberación masiva de Ca^{++} de los depósitos

intracelulares. Este aporte de Ca^{++} desde los depósitos intracelulares proporcionaría en poco tiempo la cantidad suficiente de Ca^{++}_{in} libre para iniciar la contracción. Con los $Ag \alpha_2$ la contracción tardaría más en iniciarse porque el nivel adecuado de Ca^{++}_{in} libre se conseguiría como consecuencia de un fenómeno más lento de entrada de Ca^{++}_{ex} , pero sin embargo la entrada continua de Ca^{++}_{ex} proporcionaría respuestas más mantenidas. Las dosis más altas de los $Ag \alpha_2$, metoxamina y fenilefrina podrían promover además de la movilización del Ca^{++}_{in} , la entrada del Ca^{++}_{ex} , siendo por ello más mantenidos con ellas los efectos presores. Son precisamente estas concentraciones altas de $Ag \alpha_2$, (metoxamina $\geq 100 \mu g/kg$ y fenilefrina $\geq 30 \mu g/kg$) las que pudimos ver en las curvas dosis-respuesta (págs. 101 y 103) que presentaban mayor sensibilidad al tratamiento con nifedipina.

Los resultados obtenidos en "pithed-rat" parecen en cualquier caso indicar que el Ca^{++}_{ex} es fundamental en la vasoconstricción mediada por estímulo de receptores α_2 , y esta fuente de Ca^{++} parece menos importante para la vasoconstricción por estímulo de receptores α_1 , pudiendo en este caso jugar un papel fundamental el Ca^{++} liberado de los depósitos intracelulares. La importancia del Ca^{++}_{ex} en la vasoconstricción por estímulo α_2 se puso de manifiesto con los ensayos en los que utilizamos nifedipina o BAY K 8644 como moduladores de la entrada de Ca^{++}_{ex} por canales VOC, y como acabamos de comentar también justificaría la forma en que se produce y mantiene la elevación de la PSD cuando se administra un $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat". Con las consideraciones expuestas, la fuente citoplasmática de Ca^{++} para la vasoconstricción por estímulo α_1 , podría a nuestro juicio intuirse después de los ensayos con metoxamina y fenilefrina en "pithed-rat". Hay sin embargo que considerar que en esta Tesis Doctoral el tratamiento con TMB-8 no ocasionó disminución alguna en los efectos presores de $Ag \alpha_2$ en "pithed-rat". Este compuesto, como ya se señaló en el apartado 1.3 de la Introducción, se ha caracterizado como un fármaco que bloquea la utilización del Ca^{++} del retículo sarcoplásmico. Su mecanismo de acción aparece más definido en músculo esquelético (Malagodi y Chiou 1974 b), pero su comportamiento en distintas preparaciones de músculo liso (Malagodi y Chiou 1974 a), permite también calificar a este compuesto como bloqueante intracelular del Ca^{++} . En las Figuras 24 y 25, págs. 111 y 113, pudo no obstante apreciarse que el tratamiento con TMB-8 no modificó el efecto presor de metoxamina y fenilefrina en "pithed-rat", obteniéndose un área bajo la curva y una DE_{50} similares

de Ca^{++}_{in} , el Ca^{++}_{ex} tuviese una mayor participación en la vasoconstricción producida por estímulo α_1 . Si esto fuese así, con el bloqueo de las dos fuentes alternativas de Ca^{++} se deberían obtener menores respuestas de los $Ag \alpha_1$ en "pithed-rat", que bloqueando únicamente la entrada de Ca^{++}_{ex} con nifedipina. Sin embargo en las Figuras 24 y 25, págs. 111 y 113, pudimos apreciar que el compuesto TMB-8 tampoco incrementó la inhibición producida por nifedipina. En los siguientes registros (Figuras 49 y 50, págs 192 y 193) podemos ver la inhibición del efecto presor de los $Ag \alpha_1$ producida por nifedipina, así como el efecto que produce el tratamiento con TMB-8 en ratas control y en ratas tratadas con nifedipina. Estas Figuras han reunido los registros presentados en los Resultados de esta Tesis Doctoral necesarios para facilitar estas comparaciones. Podemos observar también que la inhibición del efecto presor producido con la concentración 1000 $\mu g/kg$ de nifedipina (la más alta utilizada de este AnCa), es mucho menos acusada que la inhibición que esta concentración de nifedipina ocasionó en los efectos presores de los $Ag \alpha_2$.

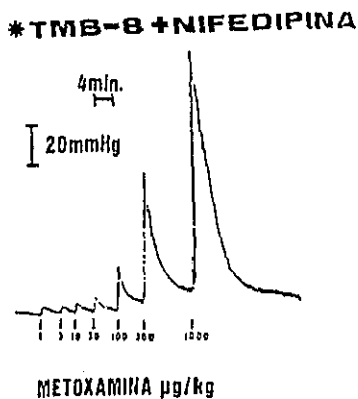
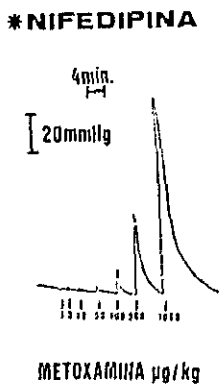
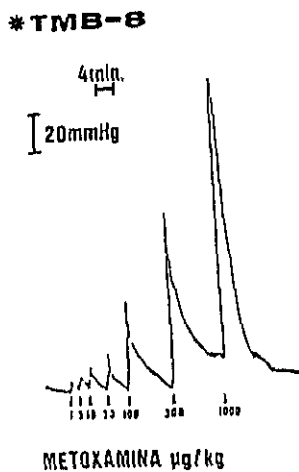
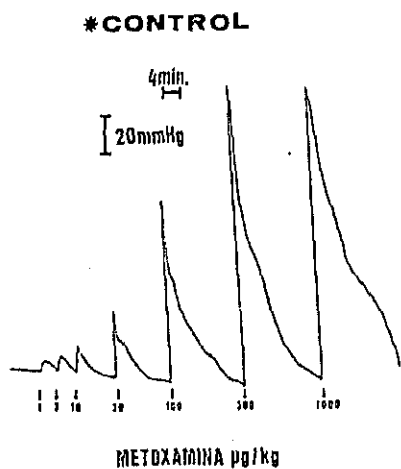


FIGURA 49.- Registros del incremento de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por la administración de metoxamina, después del tratamiento con TMB-8 y nifedipina. Tratamiento (*).

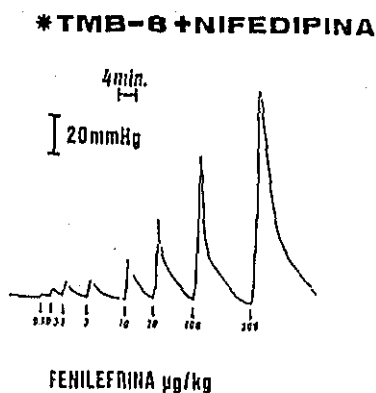
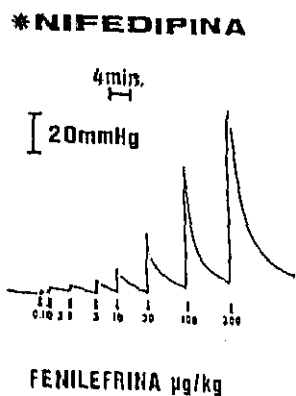
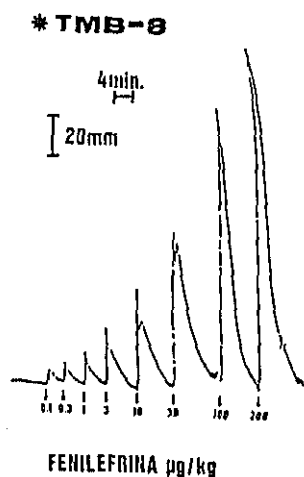
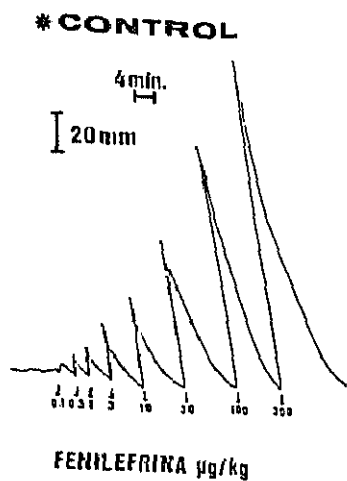


FIGURA 50.- Registros del incremento de la presión sanguínea diastólica en "pithed-rat" por la administración de fenilefrina, después del tratamiento con TMB-8 y nifedipina. Tratamiento (*).

En contra de lo que hasta aquí venimos exponiendo, estos resultados con TMB-8 en "pithed-rat" parecen negar la importancia de las reservas intracelulares de Ca^{++} en la vasoconstricción por estímulo α_1 . Como más tarde veremos los resultados obtenidos en aorta de conejo en esta Tesis Doctoral indican sin embargo que el compuesto TMB-8 interfiere con las contracciones vasculares de metoxamina y fenilefrina "in vitro". No parecen existir datos de la cinética de este fármaco en animales de experimentación que pudieran facilitar los ensayos "in vivo", pero pensamos que pueden existir mecanismos desconocidos y posiblemente consideraciones cinéticas que justificarían la falta de efecto de TMB-8 en "pithed-rat". Ya que los efectos obtenidos en esta Tesis Doctoral y aportados por otros autores cuando se utiliza TMB-8 "in vitro" requieren concentraciones elevadas del fármaco, podrían quizá ensayarse dosis más elevadas para los tratamientos de TMB-8 en "pithed-rat". Hay sin embargo que considerar que la concentración para nuestros ensayos con TMB-8 en "pithed-rat" (3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) es ya considerablemente superior a la utilizada para tratamientos con nifedipina o BAY K 8644 en esta preparación. En cualquier caso, ya que el Ca^{++} proveniente de los depósitos intracelulares parece importante para la vasoconstricción por estímulo α_1 , quizá deberían ensayarse otros compuestos capaces de interferir "in vivo" con la utilización de esta fracción de Ca^{++} . Tales compuestos serían una valiosa ayuda en las investigaciones de farmacología experimental, del mismo modo que lo son las DHP en el estudio de fármacos que utilizan la fuente de Ca^{++}_{in} para su efecto contráctil.

Distintos autores han seguido utilizando en los últimos años el compuesto TMB-8 como inhibidor de los movimientos del Ca^{++}_{in} (Aboilan y Nord 1988; Mathljo y col. 1988; Biay y Hollenberg 1989; Naito y col. 1989; Owen y Ridge 1989; Marimoto y col. 1990), pero su(s) mecanismo(s) de acción en músculo liso aún no se ha(n) esclarecido definitivamente.

4.2.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN ANILLOS DE AORTA DE CONEJO.

Los estudios en órgano aislado han resultado fundamentales para entender los mecanismos implicados en la utilización del Ca^{++} cuando se estimulan receptores α_1 vasculares. En la presente Tesis Doctoral la contracción por $Ag\alpha_1$ se ha evaluado en cada preparación estableciendo como valor 100% la altura máxima de la contracción producida por ClK 80 mM. El aumento de la concentración de K^+ en el fluido extracelular se sabe que es capaz de despolarizar la membrana celular provocando una contracción en preparaciones de aorta aislada de conejo. Los estudios de Meisner y col. en 1981 con medidas de flujos de Ca^{++} determinaron que en aorta aislada de conejo la despolarización por concentraciones elevadas de K^+ se acompañaba de la entrada de iones Ca^{++} del medio extracelular. Esta entrada tenía lugar atravesando el Ca^{++} en la membrana celular por una vía diferente de la utilizada cuando se estimulaban receptores α con NA. Diversos estudios confirmaron más tarde la existencia de canales VOC en aorta de conejo que se estimulaban por concentraciones elevadas de K^+ , y que eran sustancialmente distintos de los canales ROC activados por NA, ya que estos últimos permitían la entrada de Na^+ además de la entrada de Ca^{++} (Cauvin y Van Breemen 1985; Van Breemen y col. 1985). Imazumi y col. (1989) consiguen más recientemente demostrar con la técnica de "patch clamp" la entrada continua de Ca^{++} por canales VOC, en células de músculo liso durante la despolarización prolongada que tiene lugar con soluciones de alta concentración de K^+ .

Para evaluar el comportamiento de nifedipina como AnCa, y el comportamiento de BAY K 8644 como AgCa en anillos de aorta de conejo, hemos valorado el efecto de estos fármacos sobre las contracciones inducidas por ClK. La inhibición de la entrada del Ca^{++} por los canales VOC es selectiva y competitiva para los AnCa, y por tanto la evaluación cuantitativa de la inhibición de la vasoconstricción inducida por ClK, será una medida satisfactoria y reproducible del grado de bloqueo ejercido por un compuesto en particular. Igualmente, el potenciamiento de la contracción producida por ClK servirá como medida del potenciamiento de la entrada del Ca^{++} por canales VOC. Hay sin embargo que tener en cuenta que pese a lo dicho no está totalmente clarificada la naturaleza de las respuestas de ClK en músculo liso vascular.

La contracción inducida por K^+ en varios tejidos vasculares se ha visto que estaba compuesta del desarrollo de una contracción rápida y potente (respuesta fásica), y el desarrollo subsiguiente de una fase de contracción sostenida (respuesta tónica). Aunque en algunos tejidos vasculares la clarificación de ambos componentes de la respuesta parece difícil, en las preparaciones de anillos de aorta de conejo puede apreciarse la potente elevación inicial del tono vascular inmediatamente después de la administración de ClK, y a continuación una respuesta de contracción lenta y sostenida que alcanzó un máximo de altura aproximadamente 10 minutos después (ver Figura 34, pág. 147 de Resultados). Los AnCa inhiben ambos componentes de la respuesta, pero las respuestas tónicas se sabe que se inhiben más que las fásicas (Flaim y Zeiss 1982; Fleckenstein 1983; Itoh y col. 1984; Godfraind 1985). Los AnCa parecen inhibir competitivamente la entrada del Ca^{++} durante la contracción tónica, pero no durante la respuesta fásica, de forma que esta respuesta fásica de la contracción inducida por K^+ incluso podría depender en parte del Ca^{++} secuestrado en depósitos intracelulares. En la presente Tesis hemos utilizado la disminución de la altura máxima alcanzada por la contracción tónica de ClK 80 mM, para evaluar la capacidad de distintas concentraciones de nifedipina como bloqueantes de la entrada del Ca^{++} . La concentración 10^{-6} M de nifedipina redujo esta altura un 52%, y se seleccionó para estudiar las respuestas de $Ag\alpha$, cuando se bloquea la entrada del Ca^{++} en esta preparación. Del mismo modo para promover en este tejido la entrada de Ca^{++} al interior celular hemos seleccionado la concentración 10^{-6} M de BAY K 8644 que no indujo por sí misma contracción en preparaciones mantenidas en Krebs Henseleit (ClK 5.9 mM), pero que potenció marcadamente la contracción de ClK 30 mM y 80 mM, haciendo además que aparecieran contracciones en preparaciones despolarizadas con ClK 15 mM. El compuesto BAY K 8644 10^{-6} M no modificó la contracción de ClK 80 mM porque como ya señalamos en el apartado 3.2.A de esta Tesis Doctoral esta concentración de ClK produce la contracción máxima que puede producirse al administrar este agente, y por tanto la contracción máxima que se obtendría por entrada de Ca^{++} a través de canales VCC. Las primeras experiencias realizadas por Schramm (Schramm y col 1983 a y b) con BAY K 8644 demostraron el comportamiento de esta DHP como $AgCa$, y señalaron también que BAY K 8644 (10^{-6} - 10^{-8} M) es únicamente capaz de contraer la aorta de conejo cuando se trabaja con líquido

nutricio enriquecido en K^+ (K^+ 15 mM). Podemos también señalar las experiencias de Yamamoto y col. 1984 y de Scriabine y col. en 1986 en las que estos autores comprueban que BAY K 8644 aumenta la captura de ^{45}Ca en anillos de aorta de conejo, dependiendo este efecto de la concentración de K^+ en el medio. Así, con K^+ 15-20 mM el efecto de BAY K 8644 fue más acusado que con K^+ 5 mM en el medio extracelular, no encontrándose por otra parte mayor aumento de la captura de ^{45}Ca por BAY K 8644 con la concentración 80 mM de K^+ . Más recientemente Papaisannou y col. en 1989 estudian también la captura de ^{45}Ca en cultivos de células de músculo liso de aorta de conejo por BAY K 8644 y comprueban que esta captura aumenta en cultivos con K^+ 15-50 mM, no aumentando la captura basal en cultivos con K^+ 5mM. Aunque las preparaciones de aorta de conejo sólo se contraen con BAY K 8644 si existe una despolarización parcial (K^+ 15 mM), Hattori y col. (1986) pudieron comprobar que la DHP AgCa YC-170 ($10^{-6}M-10^{-4}M$), induce la contracción en preparaciones de aorta de conejo cuando se trabajaba con líquido nutritivo con K^+ 5.9 mM.

Hay que señalar que el compuesto BAY K 8644 no se comporta del mismo modo en todas las preparaciones vasculares. En la preparación de aorta de rata el BAY K 8644 promueve la entrada de Ca^{++} al interior celular en forma concentración-dependiente, sin requerir en este caso para ello la despolarización con K^+ 15 mM (Chiu y col. 1986 a). Otros autores (Auguet y col. 1988) señalan sin embargo que es necesaria también la despolarización parcial con K^+ para observar contracción por BAY K 8644 en aorta aislada de rata. Wanstaß y O'Donnell (1989) comprueban que en realidad las preparaciones de aorta de ratas jóvenes se contraen con BAY K 8644 sin necesidad de despolarización previa, mientras que las de ratas de mayor edad requieren una despolarización parcial con ClK para que sea posible obtener en ellas respuestas contráctiles con BAY K 8644. Esto probablemente puede deberse a que el potencial de reposo de las membranas de las preparaciones de las ratas de más edad sea más negativo. Por último recientemente Lawson y Caverio (1989) señalan que los efectos contráctiles que BAY K 8644 muestra en aorta de rata en medio carente de K^+ podrían deberse a la liberación de un factor contracturante endotelial producido por ciclooxigenasa.

Vamos ahora a justificar más detalladamente la concentración de BAY K 8644 utilizada en nuestras experiencias. Su y col. en 1984 comprobaron que en tiras de

la arteria de la cola de rata incubadas con K^+ 15 mM el efecto máximo de BAY K 8644 tuvo lugar con concentraciones $10^{-6}M$. Chiu y col. en 1985 señalan que en aorta de rata BAY K 8644 muestra igualmente efectos máximos para promover la entrada de Ca^{++} al interior celular con concentraciones $10^{-6}M$, pudiendo revertirse su efecto con nifedipina y verapamil. En los estudios de Scriabine y col. en 1986 se comprobó además que el mayor efecto de BAY K 8644 sobre la captura de ^{45}Ca en aorta de conejo se consigue también con concentraciones del fármaco comprendidas entre $10^{-6}M$ - $10^{-8}M$. No hemos querido sin embargo utilizar para nuestros ensayos concentraciones de BAY K 8644 mayores de $10^{-6}M$, debido a que este compuesto puede según diversos autores mostrar un comportamiento divalente apareciendo efectos AnCa cuando se utiliza en concentraciones elevadas (Schwartz y col. 1984; Dube y col. 1985). Además según Schramm y col. (1985 a y b) el efecto contráctil máximo de BAY K 8644 en preparaciones de aorta de conejo parcialmente despolarizadas aparece con la concentración $3 \times 10^{-7}M$, y los efectos máximos sobre la entrada de Ca^{++} con concentraciones sólo algo mayores de $3 \times 10^{-7}M$, descendiendo los efectos de BAY K 8644 con concentraciones más elevadas. Los estudios posteriores de Papasannou y col. en 1989, muestran así mismo los efectos mayores sobre captura de $^{45}Ca^{++}$ en aorta de conejo con la concentración $10^{-7}M$ de BAY K 8644. Asano y col. (1987) encuentran también con la concentración $10^{-7}M$ de BAY K 8644 potenciaciones máximas del efecto de CIK en las arterias cerebral central, coronaria y mesentérica de perro. Las concentraciones elevadas de BAY K 8644 pueden desde luego mostrar incluso efectos relajantes en preparaciones aisladas. Así Mikkelsen y col. (1988) observan la relajación de aorta de rata contraída previamente con K^+ cuando se utiliza la concentración $10^{-6}M$ de BAY K 8644.

En la presente Tesis Doctoral las concentraciones $10^{-6}M$ de nifedipina y $10^{-6}M$ de BAY K 8644 se han utilizado fundamentalmente para estudiar la modificación del efecto de los $Ag \alpha$, en anillos de aorta de conejo cuando se inhibe, y se estimula respectivamente la entrada de Ca^{++} al interior celular.

Los $Ag \alpha$ produjeron en las preparaciones de anillos de aorta de conejo una respuesta contráctil que podríamos considerar bifásica. Los trabajos iniciales de Bohr en 1963 (a los que ya aludimos en el apartado 1.6 de Introducción), determinaron la existencia de dos fases en las respuestas de aorta de conejo a NA.

La primera parte de la respuesta contráctil (respuesta rápida) podía incluso deprimirse elevando la concentración de Ca^{++} en el medio extracelular, y era precisamente el componente de respuesta lenta el que quedaba inhibido al disminuir la concentración de Ca^{++} en el medio externo (ver Figura 15, pág 66). Más tarde se comprobó que la contracción mediada por NA en aorta de conejo se debía a la liberación del Ca^{++}_{int} y/o a la entrada de Ca^{++}_{ext} (Karak y col. 1979, Van Breemen y Siegel 1980, Melsheri y col. 1981).

Ya señalamos en el apartado 3.1.B de Resultados de esta Tesis Doctoral que los Ag α , selectivos (metoxamina y fenilefrina) producían contracciones que al igual que las contracciones de NA descritas por Bohr en 1963, presentaban una fase de aumento rápido de tono, y una fase de respuesta contráctil posterior más lenta. Cuando se alcanzaban concentraciones elevadas de los Ag α , en las curvas dosis-respuesta acumulativas, el aumento de tono que se observaba después de la administración era lento desde el comienzo. Esto pudiera deberse a que las primeras dosis administradas habrían utilizado para la contracción las reservas intracelulares de Ca^{++} ; y habiéndose agotado éstas reservas, las últimas respuestas dependerían en mayor grado de la entrada de Ca^{++}_{ext} al interior celular.

La entrada del Ca^{++} responsable de la contracción tónica del músculo liso se piensa que puede tener lugar a través de canales VOC y a través de canales ROC (Godfrind 1986). En lo que respecta a los canales VOC cabe señalar que la aplicación de técnicas de parche de membrana en músculo liso vascular está ayudando en los últimos años a caracterizar estos canales. Existirían canales VOC de umbral bajo o tipo T, y canales VOC de umbral alto o tipo L que son funcionalmente más importantes en la regulación del tono vascular, y que según Benham (1990) tienen propiedades similares a los canales L descritos primeramente en células cardíacas. En la preparación de aorta de conejo existirían probablemente canales VOC tipo L.

Sin embargo los resultados presentados en esta Tesis Doctoral con nifedipina o BAY K 8644 y Ag α , en anillos de aorta de conejo, señalan la escasa participación de la entrada del Ca^{++}_{ext} por canales VOC en la vasoconstricción inducida por estímulo de receptores α . Las curvas dosis-respuesta de metoxamina y fenilefrina en anillos de aorta de conejo en presencia de nifedipina o en presencia de BAY K 8644 mostraron poca diferencia con los ensayos control, siendo similares sus DE_{50} .



y las áreas bajo las distintas curvas (Figuras 36 y 37, págs. 153 y 154). Unicamente las contracciones producidas por las concentraciones más altas de metoxamina, resultaron significativamente menores en los ensayos con nifedipina. Desde luego si la metoxamina tiene la posibilidad de utilizar para la contracción fuentes intra y extracelulares de Ca^{++} , podría agotar primeramente las reservas internas, necesitando para las contracciones últimas de las curvas acumulativas la entrada del Ca^{++}_{ext} . Lo que habría que definir es si esta entrada de Ca^{++}_{ext} tiene lugar a través de canales VOC, o bien a través de canales ROC que se activarían al interaccionar los $Ag \alpha_1$ con sus receptores. Ya hemos comentado en esta Discusión los estudios de Melisneri y col. en 1981 con medidas de flujos de Ca^{++} en aorta de conejo. En ellos se comprobó que la entrada del Ca^{++}_{ext} inducida por NA era más resistente a la inhibición por AnCa que la entrada del Ca^{++}_{ext} inducida por K^+ , y en esta preparación parece clara la existencia de canales ROC sustancialmente distintos de los canales VOC para la entrada del Ca^{++}_{ext} . Según Winslow y col. (1986) las preparaciones de aorta de conejo pueden utilizarse para distinguir fármacos que actúan sobre canales de Ca^{++} y fármacos que interfieren con la utilización de Ca^{++}_{ext} . En estas preparaciones la despolarización producida por K^+ abriría los canales VOC, y los fármacos que actuasen sobre estos canales actuarían sobre la contracción tónica sostenida de K^+ . En las respuestas α la primera fase de la contracción resultaría de la liberación del Ca^{++}_{int} , y esta fase no se debería inhibir por los AnCa. La segunda parte de la contracción α , es decir la contracción tónica de la respuesta, sería también poco sensible a los AnCa, y sería fundamentalmente debida al movimiento del Ca^{++}_{ext} por canales ROC, siendo esta entrada de Ca^{++}_{ext} aditiva con una posible entrada menor de Ca^{++}_{ext} por canales VOC. Más recientemente en la preparación de arteria de oreja de conejo se ha podido también demostrar la existencia de canales ROC mediante medidas de corrientes de Ca^{++} no asociadas a cambios de potencial de membrana y resistentes a AnCa (Droogmans y col 1987). En esta preparación sin embargo Droogmans y col. (1987) no pudieron demostrar que la NA y la fenilefrina fuesen capaces de abrir estos canales ROC cuando interaccionaban con sus receptores.

La preparación de aorta de rata presenta notables diferencias con la de aorta de conejo. En aorta de rata la entrada del Ca^{++}_{ext} que causa NA no parece resistente a la inhibición por AnCa, y puede aumentar por BAY K 8644, estando obviamente

mediada por activación de receptores α_1 , ya que se bloquea con prazosin $10^{-7}M$ y no con yohimbina $10^{-6}M$ (Chiu y col. 1986 a). En otras preparaciones la entrada de Ca^{++}_{in} que causa NA parece tener lugar también a través de canales VOC. Así Hashimoto y col. (1989), comprueban que en las arterias femorales y renales de conejo BAY K 8644 potencia las contracciones de NA, y Molderings y Schumann (1989) encuentran que BAY K 8644 puede aumentar la respuesta de NA y fenilefrina en aorta aislada de cobayo. Como hemos visto la entrada por los distintos tipos de canales puede variar en las distintas preparaciones. Aunque no parece claro que en todos los tejidos vasculares la entrada del Ca^{++}_{in} que promueve el estímulo α_1 , tenga lugar a través de canales ROC, esta podría ser la forma prioritaria de entrada de Ca^{++}_{in} cuando se estimulan los receptores α_1 en aorta de conejo. La mejor evidencia de que en esta preparación un agonista puede abrir canales ROC es que puede producir la entrada de Ca^{++}_{in} sin que exista despolarización de la membrana. Los vasos de resistencia mesentéricos de conejo se ha podido comprobar que pueden despolarizarse con NA, pero la activación de la aorta de conejo por NA no origina despolarización. Se ha señalado que cuando la NA induce entrada de Ca^{++}_{in} sin despolarización del músculo liso vascular, quizá esto acontece porque se rectifican las permeabilidades de otros iones (por ejemplo la corriente de salida de K^+) (Cauvin y Van Breemen, 1985). La activación del músculo liso vascular se acompaña en realidad de múltiples y complejas alteraciones en la permeabilidad de la membrana a los distintos iones. Friedman y Allardyce demostraron ya en 1962, la importancia de una corriente de entrada de Na^+ cuando se contraen algunas arterias con NA (Friedman y Allardyce 1962). Según varios autores (Martín y Gordon 1983; Smith y Jones 1985; Aarson y Jones 1985) en aorta de conejo y rata habría una activación de los canales de K^+ por NA, pero esta activación no sería un efecto directo sino consecuencia del incremento en el nivel de Ca^{++}_{in} libre. Según Aaronson y col. (1988) también los movimientos de Na^+ a través de la membrana durante la excitación del músculo liso vascular por NA dependieron del aumento del Ca^{++}_{in} , y en la aorta de conejo donde la NA parece provocar poca despolarización podría haber un aumento en la corriente de entrada de Na^+ que compensase el incremento en la salida de K^+ .

Hemos señalado en los párrafos anteriores que cuando se estimulan receptores α_1 en aorta de conejo la entrada del Ca^{++}_{in} tiene lugar fundamentalmente a través

de canales ROC. Esto justifica que las contracciones de Ag α , selectivos (metoxamina y fenilefrina) hayan resultado poco sensibles a nifedipina y BAY K 8644 en esta Tesis Doctoral. Hay sin embargo que considerar que el efecto de los Ag α , puede depender del potencial de membrana. El potencial de membrana se sabe hace tiempo que puede modular el efecto de los fármacos en músculo liso (Furchgott 1955; Bulbring y Burnstock 1960; Bevan y Osher 1963; Casteels y col. 1977), y las experiencias de Hondeghen y col. en 1983 demuestran que esta modulación tiene una especial relevancia en músculo liso vascular. Más recientemente se ha sugerido también que el tono inducido por un agonista se potencia por la despolarización y los canales de Ca⁺⁺ activados directamente por estímulo de receptores (canales ROC) serían también sensibles al voltaje (Molvany y Videback 1990). Volviendo a las experiencias de Hondeghen y col. en 1983, estos autores encontraron un marcado potenciamiento de la contracción de NA en anillos de aorta de conejo, y en anillos de arteria coronaria porcina (poco sensible usualmente a NA), cuando estos tejidos se despolarizaban ligeramente (alrededor de 5 mV) con concentraciones bajas de K⁺ (12-20 mM). Nuestros resultados en la presente Tesis Doctoral muestran que el Ag α , metoxamina resulta también más potente en anillos de aorta de conejo despolarizados con K⁺ 15 mM. En estas condiciones además la nifedipina inhibió en mayor grado las respuestas de metoxamina (ver Figura 42, pág.167). En las experiencias de Hondeghen y col. en 1983 los AnCa inhibieron asimismo la potenciación de la contracción de NA inducida por despolarización, aunque existía poca inhibición de las contracciones de NA cuando se trabajaba en anillos de aorta de conejo con concentraciones 4 mM de K⁺. Podemos por tanto decir que la potencia de los Ag α , puede ser mayor en tejido vascular despolarizado, siendo en este caso también mayor la potencia de los AnCa para inhibir su efecto vasoconstrictor. Cabe suponer que cuando tiene lugar una despolarización, y sobre todo cuando esta despolarización se mantiene, la entrada continua del Ca⁺⁺ por canales de Ca⁺⁺ y fundamentalmente por canales VOC, facilita el llenado de los depósitos internos que podrían ser posteriormente utilizados para la contracción por estímulo α . Según Wibo y col. (1988) la despolarización aumenta la afinidad de los canales de Ca⁺⁺ en músculo liso vascular para las DHP, y quizá por eso en estas condiciones sería mayor el efecto de estos fármacos. Este hecho pudiera tener especial relevancia en clínica. En realidad varios autores

sugirieron hace ya tiempo que en situaciones de isquemia y daño celular el acúmulo de K^+ a nivel extracelular (que conllevaría lógicamente una despolarización de la membrana), podría colaborar al mantenimiento de una vasoconstricción excesiva (Hill y Gettes 1980; Weiss y Shim 1982; Gorman y Sparks 1982). Las arterias humanas con aterosclerosis podrían también ofrecer un sustrato anatómico con las condiciones necesarias para un aumento de las respuestas α adrenérgicas vasoconstrictoras, y de hecho en modelos animales de aterosclerosis se ha comprobado un exceso de respuestas contráctiles (Kishi y Numano 1984; Kawachi y col. 1984). En estas situaciones parte del beneficio clínico de los AnCa se derivaría de su capacidad para inhibir el potenciamiento del efecto de NA inducido por la despolarización tisular, pudiéndose justificar así incluso la mejoría de la función cardíaca observada con nifedipina en la isquemia.

En el momento actual hay que tener también en cuenta que se están describiendo subtipos de adrenoreceptores α , vinculados a diferentes procesos de entrada de Ca^{++} a través de la membrana celular. La inhibición de las respuestas α , por AnCa en el tejido vascular, podría estar condicionada con la presencia de distintos subtipos de adrenoreceptores α , en las distintas preparaciones (Muramatsu y col. 1990).

En lo que concierne al Ca^{++}_{in} , su importancia para la contracción vascular por estímulo α , se puso de manifiesto en los ensayos de anillos de aorta de conejo con metoxamina y fenilefrina. Los ensayos con líquido nutritivo sin Ca^{++} prueban la importancia de estas reservas intracelulares que aportarían el Ca^{++} necesario para la contracción en estas condiciones. En estos ensayos con líquido nutritivo sin calcio, éste líquido se preparó con EGTA 5 mM, pues concentraciones iguales o inferiores de este quelante evitarían la entrada de cualquier vestigio de Ca^{++} al interior celular, quelando asimismo el Ca^{++} unido en la cara externa de la membrana celular (Saida y Van Breemen 1983; Kutsky y Hester 1986). En estas condiciones pudo comprobarse que los Ag α , mostraban aun contracción en la preparación de anillos de aorta de conejo, siendo esta contracción consecuencia únicamente de su capacidad para activar la liberación de Ca^{++} desde sus depósitos intracelulares, y mucho menor por lo tanto que la contracción control. Las Figuras 36 y 37, págs 153 y 154, muestran una notable disminución de las áreas bajo las curvas de metoxamina y fenilefrina cuando se trabaja con líquido nutritivo sin Ca^{++} , no

habiéndose podido obtener la DE_{50} de estas curvas por ser sus contracciones inferiores al 50% del efecto máximo obtenido en las curvas control.

En realidad se sabe ya hace tiempo que en músculo liso los neurotransmisores y autacoides pueden producir todavía contracciones transitorias después de remover el Ca^{++}_{ext} con EGTA o después de inhibir su entrada con La^{3+} o AnCa. Esto prueba que la liberación del Ca^{++}_{in} puede contribuir a su efecto contráctil. El principal lugar de almacén de Ca^{++}_{in} parece ser el retículo sarcoplásmico. Su existencia en músculo liso pudo demostrarse con estudios ultraestructurales en 1971 (Somlyo y col. 1971), pudiendo más tarde comprobarse que este retículo sarcoplásmico era capaz de acumular Ca^{++} en un rango milimolar (Somlyo y col. 1982). Los trabajos de Saldá (Saldá 1981; Saldá y Nonomura 1981; Saldá 1982) con preparaciones en las que la membrana se destruye mediante tratamiento con saponina prueban la liberación de Ca^{++} desde el retículo sarcoplásmico en músculo liso. Se ha podido además demostrar la liberación de Ca^{++} desde el retículo sarcoplásmico provocada por NA en arteria mesentérica de conejo. En esta preparación la NA $10^{-6}M$ indujo todavía una contracción submaximal cuando el músculo se había tratado con EGTA durante 10 minutos. Esto sería lo que pudieramos llamar contracción debida a la liberación de Ca^{++} inducida por NA. Después de la primera contracción, la administración de NA no indujo una segunda contracción, pero la administración de cafeína (25 mM) todavía inducía contracción. La administración de cafeína 25 mM aparentemente depletó el Ca^{++} del retículo sarcoplásmico, y posteriormente ya no se pudo obtener nuevamente contracción ni con NA ni con cafeína (Saldá y Van Breemen 1984 a). Por otra parte Saldá y Van Breemen (1984 b) han podido demostrar mediante medidas de liberación de $^{45}Ca^{++}$ en preparaciones de músculo liso en las que se había destruido la membrana, que el Ca^{++} puede a su vez inducir liberación de Ca^{++} desde el retículo sarcoplásmico. Esto ya se había demostrado en músculo esquelético (Endo 1970; Ford y Podolsky 1970), y en músculo cardíaco (Fabiato y Fabiato 1972), y justificaría que en los trabajos de Saldá (1982) se hubiesen obtenido menores cantidades de Ca^{++} en retículo sarcoplásmico con aportes mayores de Ca^{++} ($10^{-6}M$) que con aportes menores ($10^{-8}M$).

Los resultados obtenidos con TMB-8 en aorta aislada de conejo ponen también de manifiesto la importancia que tiene el Ca^{++}_{in} en la vasoconstricción por metoxamina y fenilefrina. Este compuesto ya sabemos que interfiere con la utilización

de Ca^{++}_{in} en músculo esquelético, y parece también capaz de bloquear la utilización de Ca^{++}_{in} en músculo liso (Malagodi y Chiou 1974 a y b; Chiou y Malagodi 1975).

Ya señalamos en esta Discusión que TMB-8 no fue capaz de modificar los efectos presores α_1 de metoxamina y fenilefrina en "pithed-rat". Sin embargo, en preparaciones de anillos de aorta de conejo concentraciones similares a las utilizadas en las experiencias de Malagodi y Chiou en 1974, y de Chiou y Malagodi en 1975, redujeron las contracciones de metoxamina y fenilefrina en forma concentración dependiente, facilitando además la inhibición de estas contracciones por nifedipina (ver Figuras 38 y 39, págs 157 y 159). En estas Figuras, puede apreciarse que con la concentración de TMB-8 $10^{-6}M$ se consigue reducir el área bajo la curva control en un porcentaje próximo al 50%, aumentando también considerablemente la DE_{50} de ambos agonistas. Del mismo modo en las Figuras 40 y 41, págs 162 y 164, puede verse que el área bajo la curva de metoxamina y fenilefrina en presencia de TMB-8 $10^{-6}M$ y nifedipina $10^{-6}M$, fue menor que el área bajo la curva en presencia de un único antagonista. Parece probable que resulte más limitante el bloqueo de la utilización del Ca^{++}_{in} por TMB-8 en presencia de un bloqueo adicional de la entrada de Ca^{++}_{ext} por canales VOC con nifedipina. Existiría probablemente un efecto sinérgico cuando se suman ambos bloqueos (extracelular e intracelular) en la utilización de Ca^{++} . Este sinergismo puede apreciarse mejor en el caso de fenilefrina, pues la inhibición de su efecto en presencia de ambos antagonistas es desde luego mucho mayor que la que cabía esperar sumando las inhibiciones parciales de los dos fármacos.

Nuestros ensayos demuestran que el compuesto TMB-8 también inhibe en esta preparación las contracciones de $K^{+}80$ mM cuando se utiliza en concentración igual o mayor de $10^{-6}M$. Malagodi y Chiou encontraron también en 1974 una inhibición con TMB-8 de las contracciones de ClK en ileon de cobayo y en deferente de cobayo, pudiéndose revertir este antagonismo al aumentar la concentración de Ca^{++} en el baño de órganos. En 1975 estos mismos autores (Chiou y Malagodi 1975) comprueban que en tiras de aorta de conejo las concentraciones de TMB-8 necesarias para inhibir respuestas equivalentes de NA y ClK eran además parecidas. La clarificación del mecanismo de acción de TMB-8 en músculo liso resulta más problemática si consideramos el efecto inhibitorio de este fármaco sobre las contracciones de ClK. Este efecto inhibitorio tuvo además lugar con concentraciones

similares a las que inhibían la contracción producida por metoxamina o fenilefrina. En músculo esquelético TMB-8 causa una potente inhibición de las respuestas de cafeína comportándose en este caso como su antagonista competitivo (Malagodi y Chiou 1974 b, Chiou y Malagodi 1975). No altera la captura de $^{45}\text{Ca}^{++}$ por el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético, pero inhibe significativamente la liberación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ inducida por cafeína en esta preparación (Chiou y Malagodi 1975). Así pues TMB-8 parece actuar de forma específica en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. En el músculo liso también parece estabilizar la unión del Ca^{++} a los depósitos celulares, pero no parece posible concretar en que sitio o sitios de almacén ejerce su efecto. En los ensayos de Malagodi y Chiou (1974) en ileon y deferente de cobayo, la reversión de su efecto al aumentar la concentración extracelular de Ca^{++} podría incluso indicar una inhibición de la entrada del Ca^{++} actuando en la membrana celular. Hay además que recordar que también en las preparaciones de aorta hemos encontrado en esta Tesis Doctoral menor inhibición de la contracción de CaCl_2 80 mM cuando el compuesto TMB-8 actúa en presencia del AgCa BAY K 8644 10^{-6}M . Si bien el mecanismo de acción de TMB-8 en músculo liso no parece claro, cabe suponer que el mecanismo de acción de TMB-8 en anillos de aorta de conejo podría implicar el bloqueo de la utilización del Ca^{++} liberado desde el retículo sarcoplásmico, y también el bloqueo del Ca^{++} citoplasmático que ha penetrado al interior de la célula después de una despolarización de la membrana. Sabiendo que TMB-8 inhibe la liberación de Ca^{++} desde el retículo sarcoplásmico en músculo esquelético, cabe pensar que en músculo liso su efecto implique también el secuestro de Ca^{++} en los lugares de almacén. TMB-8 podría inhibir en músculo liso vascular la liberación de Ca^{++} desde la membrana plasmática o el retículo sarcoplásmico cuando esta liberación es consecuencia del estímulo directo de un agonista, pero podría también inhibir la liberación de Ca^{++} desde depósitos internos, si esta liberación se induce por la entrada de Ca^{++} cuando se despolariza la membrana (ya indicamos en páginas anteriores que en preparaciones de músculo liso la entrada de Ca^{++} puede a su vez movilizar el Ca^{++} del retículo sarcoplásmico).

Los resultados obtenidos en anillos de aorta de conejo establecen claramente la necesidad de la liberación de Ca^{++} para la vasoconstricción por estímulo α_1 . Como bien sabemos, otra de las preparaciones muy utilizadas para estudios con

agonistas α , "in vitro", es la de aorta de rata. Chiu y col. (1986 a) en aorta de rata, comprobaron la eficacia de un Ag α , para producir efecto contráctil podía depender aún más de su capacidad para activar la liberación de Ca^{++}_m que de su capacidad para estimular la entrada del Ca^{++}_{ext} . Al mismo tiempo estos mismos autores comprueban (Chiu y col. 1986 b) que en aorta de rata (al igual que hemos señalado que podía acontecer cuando se trabaja en "pithed-rat"), la capacidad de los Ag α , para utilizar fuentes intra o extracelulares de Ca^{++} podía variar con cada agonista. La forma en que un agonista interactúa con los receptores α , vasculares, determinaría qué proceso es activado, y hasta qué punto. Sin embargo habría que señalar que para contraer la aorta de rata, un agonista total requeriría la activación de ambos procesos, promoviendo siempre la entrada del Ca^{++}_{ext} así como la liberación del Ca^{++}_m . Así en los ensayos de Chiu y col. en aorta de rata (1986 b), la I-NA se comportaba como un agonista total para promover la liberación de Ca^{++}_m , pero en presencia de nifedipina solo producía respuestas de aproximadamente un 63% del valor de las respuestas control, ya que en esta preparación la contracción inducida por estímulo α , invariablemente se acompañaba además de la entrada de Ca^{++}_{ext} . Así pues, en aorta de rata aún no se ha identificado un agonista capaz de provocar una contracción por estímulo α , que dependa exclusivamente de la liberación del Ca^{++}_m y resulte por tanto insensible a los AnCa. La I-fenilefrina que también se comporta según Chiu y col (1986 b) como agonista total en aorta de rata, mostró sin embargo en esta Tesis Doctoral insensibilidad a nifedipina en los ensayos de aorta de conejo. Cabe suponer que en aorta de conejo fuesen incluso más importantes las reservas intracelulares de Ca^{++} para la contracción por estímulo α , pero no podemos olvidar que según hemos señalado ya en esta Discusión el movimiento del Ca^{++}_{ext} en aorta de conejo cuando se estimulan receptores α , tendría lugar probablemente a través de canales ROC, poco sensibles a los AnCa. Recordemos también que la entrada del Ca^{++}_{ext} pareció más importante para la contracción del agonista selectivo metoxamina en anillos de aorta de conejo, habiéndose comprobado en esta Tesis Doctoral su sensibilidad a nifedipina $10^{-6}M$. En aorta de rata Chiu y col. (1986 b) comprobaron que el estímulo α , podía incluso facilitar exclusivamente la entrada de Ca^{++}_{ext} . Esto sucedía con el compuesto Sgd 101/75 que no presentaba un componente de respuesta contráctil insensible a nifedipina, de forma que la nifedipina $10^{-6}M$ - $10^{-8}M$ inhibía las

contracciones de Sgd 101/75, y las contracciones por concentraciones elevadas de K^+ con igual potencia. El compuesto Sgd 101/75 ya señalamos en esta Discusión, que se clasificó como agonista parcial en los ensayos en ratas y gatos desmedulados, ocasionando respuestas vasoconstrictoras que resultaban también marcadamente sensibles a nifedipina (Timmermans y col. 1983 b, c; Mathy y col. 1983).

Considerando las teorías de los diferentes grupos investigadores, así como nuestros resultados "in vitro" con $Ag \alpha_1$, podemos decir que tanto en aorta de conejo como en aorta de rata el estímulo α_1 promueve la entrada de Ca^{++}_{int} además de la liberación de Ca^{++}_{int} , pero existiendo algunas diferencias entre ambas preparaciones. Para precisar estas diferencias, diríamos que en aorta de conejo la entrada de Ca^{++}_{int} por estímulo de receptores tiene lugar sobre todo por canales ROC, siendo el estímulo α_1 poco sensible a los AnCa si el tejido no está despolarizado. En aorta de rata esta entrada de Ca^{++}_{int} podría tener lugar por el contrario a través de canales VOC sensibles a los AnCa. En aorta de rata además parece claro que el estímulo α_1 siempre conlleva una entrada de Ca^{++}_{int} , incluso cuando el estimulante es un $Ag \alpha_1$ total, pudiendo algunos $Ag \alpha_1$ parciales facilitar exclusivamente la entrada de Ca^{++}_{int} .

En realidad la principal diferencia que Chiu y col señalan (Chiu y col. 1986 b) al clasificar los $Ag \alpha_1$ en aorta de rata con el sistema utilizado por el grupo de Timmermans trabajando en "pithed-rat" es que la actividad intrínseca de un agonista α_1 en aorta de rata dependería no sólo de su capacidad para liberar Ca^{++}_{int} sino también de su capacidad para promover la entrada de Ca^{++}_{int} . Así la mayor eficacia se obtendría cuando ambas vías de utilización de Ca^{++} se pudiesen en marcha en condiciones óptimas. En su momento señalamos en esta Discusión que fármacos clasificables como agonistas totales, tales como metoxamina o fenilefrina, mostraron en esta Tesis Doctoral sensibilidad al tratamiento con nifedipina en "pithed-rat". Esto permitiría a nuestro juicio mantener una hipótesis semejante a la de Chiu también cuando se trabaja "in vivo".

Pasamos ahora a discutir los resultados obtenidos en aorta de conejo con los agonistas selectivos α_1 (B-HT 920 y B-HT 933). En primer lugar hay que señalar que no parece existir dificultad alguna en poner de manifiesto la existencia de receptores α_1 postsinápticos en preparaciones de vasos aislados, pero como ya

indicamos en el apartado 1.6 de Introducción de esta Tesis Doctoral, hasta este momento han existido muchas dificultades para demostrar claramente la participación del estímulo α_2 en la vasoconstricción inducida "in vitro" por distintos agonistas. Existen por tanto pocos vasos aislados en los que se manifiesten claras respuestas α_2 . En las venas podría existir mayor densidad de receptores postsinápticos α_2 que en las arterias, siendo precisamente la vena safena de perro una de las principales preparaciones donde han podido manifestarse inequívocamente las respuestas α_2 vasoconstrictoras (Curro y Greenberg 1983; Fowler y col. 1984; Fiavahan y col. 1984, 1987; Creuntz y col. 1985; Yine y Mattheus 1985; Hieble y col. 1986; Bou y Massingham 1986; Rhodes y Watergall 1987; Guimaraes y col. 1987; Jayakody y col. 1987). También en algunas otras preparaciones aisladas ha podido ponerse de manifiesto la existencia de receptores α_2 . Entre ellas figuran las de venas y arterias mesentéricas caninas (Kou y col. 1984; Itoh y col. 1987), la arteria de la cola de rata (Medgett 1985; Medgett y Langer 1986), la vena safena de rata (Cheung 1985), la vena safena humana (Docherty y Hyland 1985) y las arterias digitales humanas obtenidas "postmortem" (Moulds y Stevens 1984; Stevens y Moulds 1985; Stevens y Moulds 1986). En todas estas preparaciones los receptores α_2 postsinápticos parece que podrían activarse por la liberación de NA desde los nervios, lo cual resulta curioso, ya que en el músculo liso vascular los nervios simpáticos inervan preferentemente, sino exclusivamente, los receptores α_1 postsinápticos (Docherty y McGrath 1980; Yamaguchi y Kopin 1980; Langer y col. 1980; Willfert y col. 1982; Langer y Shepperson 1982). La localización de estos receptores α_2 como ya señalamos en el apartado 1.5 de la Introducción sería próxima a la adventicia, quedando los receptores α_2 localizados en la íntima y más cercanos al lumen. Recientemente el grupo de Vanhoutte (Komori y col. 1990), confirma nuevamente que en la vena safena de perro existen receptores α_2 , y la NA estimula fundamentalmente estos receptores cuando se libera por los nervios simpáticos y también cuando se administra exógena. Estos autores comprueban también que en esta preparación la denervación causa un aumento de las respuestas al estímulo por agonistas α_2 , no afectándose las respuestas de fenilefrina.

Dado que "in vivo" el Ca^{++}_{sm} parece tan importante para los incrementos presores por estímulo α_2 , cabe suponer que también las respuestas vasoconstrictoras "in vitro" dependen en gran medida del Ca^{++}_{sm} . En realidad la contracción por

estímulo α_2 en la vena safena canina se sabe que depende de la concentración de Ca^{++}_{ext} , y la retirada de este Ca^{++}_{ext} inhibe las correspondientes respuestas (Jim y Matthews 1985). En esta preparación algunos AnCa como diltiazem o nicaldipina no inhibieron significativamente la contracción del Ag α_2 selectivo B-HT 920 (Jayakody y col. 1987) pero otros AnCa como verapamil inhibieron la contracción del Ag α_2 UK-14,304 con una clara depresión de su efecto máximo (Gulmaras y col. 1987). En la arteria digital humana aislada, ni los receptores α_1 , ni los receptores α_2 parecen vinculados de forma importante a la entrada del Ca^{++}_{ext} (Stevens y Moulds 1986), y cabe además señalar que pese a la importancia que parece tener el Ca^{++}_{ext} para la contracción vascular por estímulo de receptores α_2 , recientemente Guan y col. (1989), utilizando tiras de vena safena de perro demuestran que la activación de receptores α_2 por B-HT 920 en Krebs carente de Ca^{++} y con EGTA $5 \times 10^{-6}M$, conlleva la utilización de Ca^{++} proveniente de una fuente intracelular.

En esta Tesis Doctoral hemos intentado poner de manifiesto respuestas α_2 en la preparación de anillos de aorta de conejo. En esta preparación no hemos encontrado hasta la fecha trabajos en los que los Ag α_2 selectivos consigan producir respuestas claramente debidas al estímulo de receptores α_2 , y las respuestas de agonistas mixtas α_1 - α_2 como NA, parecen debidas exclusivamente al estímulo α_1 . Cabe sin embargo suponer que en esta preparación las respuestas α_2 únicamente pudieran manifestarse si forzamos la entrada del Ca^{++}_{ext} al interior celular. Con esta premisa fácilmente podemos justificar el escaso efecto contráctil que los Ag α_2 selectivos B-HT 920 y B-HT 933 han ocasionado cuando trabajábamos con la preparación de anillos de aorta de conejo en condiciones control (ver Figuras 44 y 45, págs 172 y 174). El efecto contráctil de B-HT 920 y B-HT 933 en anillos de aorta de conejo en condiciones control sería además muy probablemente consecuencia del estímulo α_1 que éstos fármacos pudieran ocasionar, ya que pudo inhibirse totalmente con prazosin $10^{-6}M$. En realidad otros autores han comprobado que concentraciones elevadas de B-HT 920 son capaces de contraer la aorta aislada de conejo, pero los efectos de este fármaco también en aquellos experimentos parecían debidos al estímulo de receptores α_1 (Lues y Schümann 1984, Bou y Massingham 1986).

En las Figuras 44 y 45 págs.172 y 174, pudimos apreciar que las contracciones de B-HT 920 y B-HT 933 se potenciaban si forzábamos la entrada de Ca^{++}_{ext} en las

preparaciones de anillos de aorta de conejo con BAY K 8644. Puede apreciarse que con B-HT 920 el área bajo la curva dosis-efecto es unas 4 veces mayor en presencia de BAY K 8644, y así mismo el área bajo la curva dosis-efecto de B-HT 933 es unas 7 veces mayor en presencia de BAY K 8644. Puede también apreciarse una acusada disminución de la DE_{50} de ambos agonistas en presencia de BAY K 8644. En este sentido, podemos señalar que BAY K 8644 también potenció las respuestas de B-HT 920 en la vena safena de rata (Cheung 1985). Por su parte, Sulpizio y Heble en 1987 también comprobaron que el compuesto B-HT 920 sólo producía contracciones consistentes en la arteria safena canina aislada en presencia de BAY K 8644. Las respuestas en arteria safena canina producidas por B-HT 920 eran para estos autores indudablemente inducidas por estímulo α_2 postsináptico, ya que se inhibían cuando se bloqueaban estos receptores con rauwolfina, y no se modificaban con el bloqueo de receptores α_1 por prazosín. Del mismo modo en nuestro caso pudimos revertir parcialmente el efecto vasoconstrictor de B-HT 920 y B-HT 933 en presencia de BAY K 8644 cuando los ensayos se llevaban a cabo después de bloquear los receptores α_2 con yohimbina. Así en las Figuras 44 y 45, las curvas dosis-respuesta de los Ag α_2 mostraron nuevamente un desplazamiento a la derecha cuando los ensayos tenían lugar incubando las preparaciones con yohimbina $10^{-6}M$. Esto pondría de manifiesto una implicación de receptores α_2 en las respuestas con B-HT 920 y B-HT 933 en presencia de BAY K 8644. Por otra parte en algunos ensayos llevados a cabo con B-HT 920 y B-HT 933 en presencia de BAY K 8644, hemos intentado eliminar el posible estímulo de receptores α_1 , bloqueando éstos con prazosín $10^{-6}M$. Sin embargo, en estas condiciones únicamente el Ag α_2 que mostró mayor potencia en esta preparación, es decir el compuesto B-HT 920, se mostró capaz de producir contracciones. Estas serían únicamente consecuencia del estímulo α_2 , como lo prueba el hecho de que no aparecieran si además las preparaciones se incubaban con yohimbina $10^{-6}M$. En estas condiciones, las respuestas de B-HT 920 ya hemos señalado en el apartado 3.2.C de Resultados, que no eran respuestas mantenidas, apareciendo varias contracciones consecutivas de magnitud decreciente después de la administración del agonista (ver Figura 46, pág. 176). A la luz de los conocimientos actuales es difícil justificar estas contracciones probablemente debidas al estímulo de receptores α_2 en las preparaciones de anillos de aorta de conejo, pero sin ninguna duda existen diferencias marcadas entre las contracciones α_2 y

las contracciones de otros agonistas en esta preparación. La Figura 51, pág.214 muestra las contracciones obtenidas en esta preparación por CIK, por un $\text{Ag } \alpha_1$ y por un $\text{Ag } \alpha_2$. Con nuestros conocimientos intentaremos resumir las diferencias que pudiera haber en el aporte de Ca^{++} para estas contracciones. El CIK es capaz de producir una despolarización en la membrana que ocasiona la apertura de canales VOC y la entrada del Ca^{++} por estos canales. La respuesta fásica de la contracción podría depender también en parte del Ca^{++} secuestrado en depósitos intracelulares, pero la contracción tónica se debería únicamente a la entrada de Ca^{++} por canales VOC. En las respuestas α_1 , la primera fase de la contracción tiene lugar como consecuencia de la utilización del Ca^{++} de los depósitos intracelulares, y la fase de contracción tónica también se debe a la entrada de Ca^{++} . En el caso de la aorta de conejo esta entrada tiene lugar sobre todo por canales ROC, pudiendo en otros tejidos vasculares tener mayor importancia la entrada de Ca^{++} por canales VOC para la contracción mantenida. Los $\text{Ag } \alpha_2$ que parecen necesitar en mayor medida el Ca^{++} para su efecto contráctil, podrían despolarizar parcialmente la membrana, permitiendo la entrada de Ca^{++} por canales VOC cuando actúan en presencia de un AgCa (BAY K 8644). Es decir, el estímulo de receptores α_2 , sería capaz de despolarizar la membrana celular hasta un nivel en el que se podrían producir contracciones fásicas oscilantes. Estas estarían motivadas por la entrada de Ca^{++} que BAY K 8644 ocasiona en tejido parcialmente despolarizado. En cualquier caso, la forma en que tiene lugar la apertura de los canales VOC para la entrada de Ca^{++} como consecuencia del estímulo α_2 , sería sustancialmente distinta de la apertura de los canales VOC consecuente a la despolarización con CIK. La apertura de los canales cuando interacciona BAY K 8644, podría implicar una modificación distinta en los estados conformacionales del canal. Después del estímulo de receptores α_2 , se produciría una activación inicial de canales de Ca^{++} por BAY K 8644, con un incremento de Ca^{++} y de tono contráctil. Después de la activación inicial de los canales de Ca^{++} estos podrían entrar en un estado de inactivación, y a medida que el nivel de Ca^{++} libre disminuye como consecuencia de su utilización, se produciría la relajación de la fibra vascular. Con la reactivación de los canales de Ca^{++} nuevamente podrían conseguirse niveles de Ca^{++} libres suficientes para un nuevo efecto contráctil. Esta reactivación podría resultar cada vez más costosa y el aporte de Ca^{++} "in vitro" por el procedimiento

descrito cubriría cada vez con más dificultad los requerimientos necesarios para poner en marcha el mecanismo contráctil. Por este motivo las contracciones resultarían cada vez menores. Aunque hemos tratado de justificar nuestros resultados en términos de activación y desactivación de canales del Ca^{++} , será necesario utilizar otras técnicas (medidas de flujo de Ca^{++} , "patch clamp",...), y realizar nuevos ensayos en distintas condiciones experimentales, para poder llegar a conocer más exactamente como tiene lugar la utilización de Ca^{++} cuando se provocan contracciones por estímulo de receptores α_2 en vasos aislados, y más concretamente en aorta de conejo.

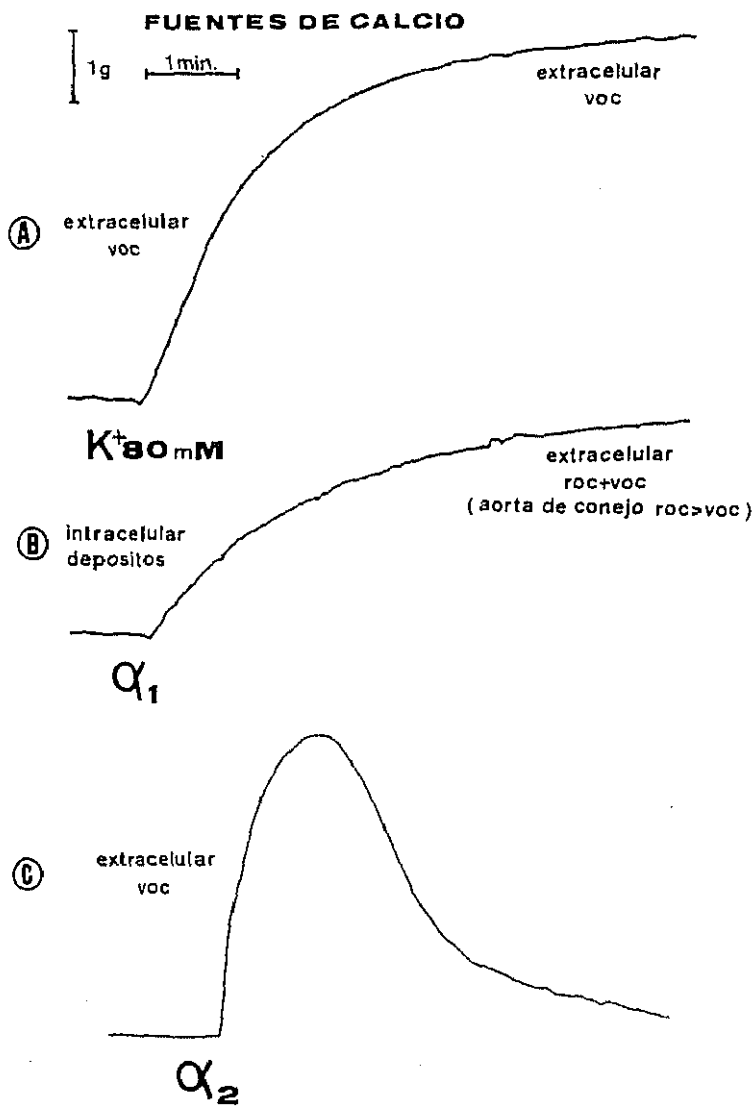


FIGURA 51.- Registros de la contracción en la preparación de anillos de aorta de conejo producida por: (A) ClK 80 mM, (B) un Ag α_1 , (C) un Ag α_2 .

5.- CONCLUSIONES

- 1.- Nifedipina y BAY K 8644 ocasionan respectivamente descensos y aumentos de la PSD en "pithed-rat" más señalados cuando se administran en la yugular que cuando se administran en el cayado de aorta. En este último caso parece posible evitar sus efectos cardiológicos, resultando ésta vía de administración idónea para estudiar los efectos vasculares de las DHP en "pithed-rat".
- 2.- Los Ag α_1 (metoxamina y fenilefrina) y los Ag α_2 (B-HT 920 y B-HT 933) producen aumentos presores dosis-dependientes en la preparación de "pithed-rat". El aumento de la PSD se produce más lentamente y es de mayor duración en el caso de los Ag α_2 , pudiendo esto implicar diferencias en el mecanismo vasoconstrictor de ambos tipos de agonistas.
- 3.- La entrada de Ca^{++}_{int} por canales VOC es más importante para el efecto vasoconstrictor mediado por estímulo de receptores α_2 vasculares que para el efecto vasoconstrictor mediado por estímulo de receptores α_1 vasculares, ya que las respuestas presoras de Ag α_2 en "pithed-rat" fueron más sensibles al tratamiento con nifedipina o BAY K 8644, que las respuestas presoras de Ag α_1 en esta misma preparación.
- 4.- La concentración 3000 μ g/kg del bloqueante de Ca^{++}_{int} TMB-8 no fue capaz de modificar el efecto de metoxamina y fenilefrina en "pithed-rat", resultando por tanto el efecto vasopresor α_1 en esta preparación más sensible al bloqueo de la utilización del Ca^{++}_{int} .
- 5.- Nifedipina se comporta como AnCa en la preparación de anillos de aorta de conejo, inhibiendo en forma concentración-dependiente las contracciones producidas por ClK 80 mM. Por el contrario BAY K 8644 se comporta como AgCa en esta misma preparación cuando se utiliza en concentración 10^{-6} M, produciendo contracción en preparaciones parcialmente despolarizadas ($K^{+}15$ mM), y potenciando las contracciones de ClK 30 mM y ClK 60 mM.

6.- Los Ag α_1 (metoxamina y fenilefrina) producen contracciones mantenidas concentración-dependientes en la preparación de anillos de aorta de conejo. Su efecto en esta preparación es consecuencia de la utilización de Ca^{++}_{ext} y Ca^{++}_{int} , ya que dichas contracciones son menores cuando se trabaja con líquido nutritivo sin Ca^{++} y con EGTA 0.5 mM.

7.- La entrada de Ca^{++}_{ext} por canales VOC parece poco importante para la contracción de Ag α_1 selectivos en anillos de aorta de conejo, no modificándose casi en esta preparación el efecto de metoxamina y fenilefrina cuando se trabaja en presencia de nifedipina ($10^{-6}M$) o BAY K 8644 ($10^{-6}M$). Cuando se estimulan en aorta de conejo receptores α_1 , el Ca^{++}_{ext} podría acceder al interior celular fundamentalmente por canales ROC.

8.- En condiciones de despolarización el efecto vasoconstrictor α_1 puede aumentar, siendo también mayor en este caso el efecto de nifedipina. Este hecho puede apreciarse en la preparación de anillos de aorta de conejo trabajando con líquido hiperpotásico (K^+15 mM).

9.- En la preparación de anillos de aorta de conejo el bloqueante de Ca^{++}_{int} TMB-8 inhibe en forma concentración-dependiente las contracciones de los Ag α_1 selectivos (metoxamina y fenilefrina), así como las contracciones de ClK 60 mM, resultando en presencia de BAY K 8644 ($10^{-6}M$) menor la inhibición de estas últimas. Esto pone de manifiesto la importancia del Ca^{++}_{int} para la contracción de esta preparación por Ag α_1 , y sugiere que TMB-8 podría bloquear la utilización de Ca^{++} cuando éste ha accedido al interior celular por canales VOC.

10.- Los Ag α_2 (B-HT 920 y B-HT 933) producen contracciones concentración-dependientes en la preparación de anillos de aorta de conejo, pero muestran una potencia mucho menor que los Ag α_1 (metoxamina y fenilefrina) en esta preparación. Además, el débil efecto contráctil de B-HT 920 y de B-HT 933 en aorta de conejo es posiblemente consecuencia del estímulo de receptores α_1 , ya que no aparece cuando se bloquean estos receptores con prazosín ($10^{-6}M$).

11.- Para que se contraiga la preparación de anillos de aorta de conejo por estímulo de receptores α_2 , parece necesaria la entrada de Ca^{++} por canales VOC, ya que en presencia de BAY K 8644 ($10^{-6}M$) se potencian significativamente las contracciones de B-HT 920 y de B-HT 933, pudiendo revertirse parcialmente este potenciamiento cuando se bloquean los receptores α_2 con yohimbina ($10^{-6}M$).

12.- Cuando se producen contracciones con B-HT 920 en presencia de BAY K 8644 ($10^{-6}M$) después del bloqueo de receptores α_1 , en la preparación de anillos de aorta de conejo, estas contracciones se deberían únicamente al estímulo de receptores α_2 , ya que no aparecen en presencia de yohimbina ($10^{-6}M$). Las contracciones producidas por B-HT 920 en estas condiciones no son contracciones mantenidas, apareciendo varias contracciones fásicas de magnitud decreciente después de la administración del fármaco. Pensamos que los mecanismos de utilización de Ca^{++} que conlleva el estímulo de receptores α_2 en aorta de conejo, merecen esclarecerse mejor en posteriores estudios con técnicas distintas a las utilizadas en este trabajo.

6.- BIBLIOGRAFIA

- AARONSON P. and JONES A. W. (1985). Ca^{++} regulation of K^+ fluxes in rabbit aorta during activation by noradrenaline or high K^+ medium. *J. Physiol Lond.*, 367: 27-43.
- AARONSON P.I. and JONES A. W. (1988). Ca^{++} dependence of Na^+ Influx during treatment of rabbit aorta with NE and high K^+ solutions. *Am. J. Physiol.*, 254: C75-C83.
- ABDEL-LATIF A.A. (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generator of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38(3): 227-272.
- ABOOLIAN A. AND NORD E.P. (1988) Bradykinin increases cytosolic free Ca^{++} in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 255: F486-F493.
- AHLQUIST R. R. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153: 586-600.
- ALMERS W.; ROBERTS W. M.; and RUFF R.L. (1984). Voltage clamp of rat and human skeletal muscle: measurements with an improved loose-patch technique. *J. Physiol. (Lond)*, 347:751-768.
- ARTALEJO C.R. y GARCIA A. G. (1987). Los calcioantagonistas. *Medicina Integral*, 9(6): 281-292.
- ASANO M; AOKI K; SUZUKI J. and MATSUDA T. (1987). Effects of BAY K 8644 and nifedipine an isolated dog cerebral coronary and mesenteric arteries. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 242 (2): 646- 656.
- AUGUET M.; DELAFLOTTE S.; CHABRIER P.E.; PIROTZKY E.; CLOSTRE F. and BRAQUET P. (1988). Endothelin and Ca^{++} agonist Bay K 8644: different vasoconstrictive properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158: 186-192.
- BEAN B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J. Gen. Physiol.*, 86: 1-30.

BENHAM (1990). Vascular smooth muscle calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* 183(1): 9

BERRIDGE M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.*, 220: 345-360.

BERRIDGE M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 159- 193.

BEVAN J. and OSHER J. (1963). Effects of potassium on the resting length of vascular smooth muscle of the rabbit aorta and its response to L-norepinephrine. *Circ. Res.*, 13: 346-351.

BIDEN T. J.; WOLLHEIM C. B. and SCHLEGEL W. (1986). Inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular Ca^{++} homeostasis in clonal pituitary cells (GH₃). Translocation of Ca^{++} into mitochondria from a functionally discrete portion of the nonmitochondrial store. *J. Biol. Chem.*, 261: 7223-7229.

BLACKSHEAR J. L.; GARMIC D.; WILLIAMS G. A.; HARRINGTON D. P. and HOLLENBERG N. K. (1987). Exaggerated renal vasodilatator response to calcium entry blockade in first-degree relatives of essential hypertensive subjects. *Hypertension*, 9: 384-389.

BLAY J. AND HOLLENBERG M.D. (1989). Epidermal growth factor stimulation of prostacyclin production by cultured aortic smooth muscle cells: requirement for increased cellular calcium levels. *J. Cell. Physiol.* 139: 524-530.

BOHR D. F. (1963). Vascular smooth muscle: Dual effect of calcium. *Science*, 139: 597-599.

BOLGER G.T.; GENGO P.; KLOCKOWSKI R.; LUCHOWSKI E.; SIEGEL H.; JANIS R.A.; TRIGGLE S. M. and TRIGGLE. D. J. (1983). Characterization of binding of the Ca^{++} channel antagonist, (³H)-nitrendipine, to guinea-pig ileal smooth muscle. *J. Pharmacol.*

Exp. Ther., 225: 291-309.

BOLTON T. B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 59: 606-718.

BORLE A.B. and SNOWDOWNE K.W. (1982). Measurement of intracellular free calcium in monkey cells with alquorin. *Science*, 217: 252-254.

BOU J. and MASSINGHAM R. (1986). Effect of diltiazem upon contractile responses to phenylephrine, clazolina, Sgd 101/75, St 587 and B-HT 920 in rabbit aorta and dog saphenous vein preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, 121: 319-325.

BOWMAN W.C. y RAND M.J. (1984). *Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas. Cap.2: 4.*

BRISSON A. and UNWIN P. N. T. (1985). Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature*, 315: 474-477.

BROWN A. M.; YATANI A.; LACERDA A. E.; GURNOLA G. B. and POSSANI L.D. (1987). Neurotoxins that act selectively on voltage-dependent cardiac calcium channels. *Cir. Res.*, 61 (Suppl. 1): 18-19.

BULBRING E. and BURNSTOCK G. (1960). Membrane potencial changes associated with tachyphylaxis and potentiation of the response to stimulating drugs in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 15: 611-624.

CASTEELS R.; KITAMURA K.; KURIYAMA A. and SUZUKI A. (1977). Excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol. (Lond)*, 271: 63-79.

CATTERALL W. A. (1986). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.

CAUVIN C. and MALIKS (1984). Induction of Ca^{++} influx and intracellular Ca^{++} release in isolated rat aorta and mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of alpha-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 413-418.

CAUVIN C. and VAN BREEMEN C. (1985). Different Ca^{++} channels along the arterial tree. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (40): S4-S10.

COCKCROFTS S.; BALDWIN J. M. and ALLAN D. (1984). The Ca^{++} -activated polyphosphoinositide phosphodiesterase of human and rabbit neutrophil membranes. *Biochem J.* 221: 477-482.

COCKCROFTS S.; TAYLOR J. A. and JUDAH J. D. (1985). Subcellular localization of inositol lipid kinases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 845: 163-170.

COLLINS C. A. and WELLS W. W. (1983). Identification of phosphatidylinositol kinase in rat liver lysosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258: 2130-2134.

CONNOLLY T. M.; BROSS T. E. and MAHERNS P. W. (1985). Isolation of a phosphomonoesterase from human platelets that specifically hydrolyzes the 5-phosphate of inositol 1,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 260: 7868-7874.

CONTI M. A. and ADELSTEIN R. S. (1981). The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3',5' cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3178-3181.

CONTI-TRANCONI B. M.; DUNN S. M. J.; BARNARD E. A.; DOLLY J. O.; LAI A.; RAY N. and RAFTERY M. A. (1985). Brain and muscle nicotinic acetylcholine receptors are different but homologous proteins. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5208-5213.

COOKE J. P.; RIMELE T. J.; FLAVAHAN N. A. and VANHOUTTE P. M. (1985). Nimodipine and inhibition of alpha-adrenergic activation of the isolated canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 598-602.

COTTON F. A. y WILKINSON G. (1986). Química inorgánica avanzada. 1ª Edición. Cap. 7 y 8: 315-357.

CREUTZ C. E.; DOWLING L. G.; KYGER E. M. and FRANSON R. C. (1985). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity of chromaffin granule-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 260: 7171- 7173.

CURRO F. A. and GREENBERG S. (1983). Characteristics of postsynaptic alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors in canine vascular smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61: 893-904.

CHEUNG W. Y. (1982). Calmodulina. *Investigación y Ciencia*. Agosto: 28-37.

CHEUNG D. W. (1985). The effect of BAY K 8644 on contraction mediated by alpha-adrenoceptors in the rat saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* 85: 317-319.

CHIOU C. Y. and MALAGODI M. H. (1975). Studies on the mechanism of action of a new Ca^{++} antagonist 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 53: 279-285.

CHIU A.T.; McCaLL D.E.; THOOLEN M. J. M. C. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1985). Ca^{++} utilization of alpha-1 adrenoceptor agonists in rat aorta. *Pharmacologist* 27: 144

CHIU A. T.; McCaLL D. E. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1986 a). Pharmacological characteristics of receptor-operated and potential-operated channels in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 127: 1-8.

CHIU A. T.; McCaLL D. E.; THOOLEN M. J. M. C. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1986 b). Ca^{++} utilization in the constriction of rat aorta to full and partial alpha-1 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 224-231.

DANIELLI J.F. and DAVSON H.A. (1935). A contribution to the theory of permeability

of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.*,5: 495

DE MEY J. and VANHOUTTE P. M. (1981). Uneven distribution of postjunctional alpha-1 and alpha-2 like adrenoceptors in canine arterial and venous smooth muscle. *Cir. Res.* 48: 875-884.

DE MEY J. and VANHOUTTE P. M. (1988). Differences of pharmacological properties of postjunctional alpha-adrenergic receptors among arteries and veins. *Arch. Int. Pharmacodyne Ther.* 244: 326-329.

DILLON P. F.; AKSOY M. O.; DRISKA S. P. and MURPHY R. A. (1981). Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 211: 495-497.

DOCHERTY J. R. and MCGRATH J. C. (1980). A comparison of pre- and post-junctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygens of the rat. Evidence for two types of postjunctional alpha-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 312: 107-116.

DOCHERTY J. R. and HYLAND L. (1985). Vascular alpha-2 adrenoceptors mediate nerve stimulation-evoked contractions. *Clin. Sci. (oxf)* 68: S117-S121.

DOCHERTY J. R. (1988). The effects of ageing on vascular alpha-adrenoceptors in pithed rat and rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 1-5.

DOWNES P. and MICHELL R. H. (1982). Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: lipids in search of a function. *Cell. Calcium* 3: 467-502.

DROOGMANS G.; HIMPENS B. and CASTEELS R. (1985). Ca-exchange, Ca-channels and Ca-antagonists. *Experientia* 41: 895-899.

DROOGMANS G.; DECLERCK I. and CASTEELS R. (1987). Effect of adrenergic

- agonists on Ca²⁺ channel currents in single vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 409: 7-12.
- DUBE G. P.; BAIK Y. and SCHWARTZ A. (1985). Effects of a novel calcium channel agonist dihydropyridine analogue, BAY K 8644, on pig coronary artery. Biphasic mechanical response and paradoxical potentiation of contraction by Diltiazem and Nimodipine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7: 377-389.
- ENDO M.; TANAKA M. and OGAWA Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibers. *Nature* 228: 34
- FABIATO A. and FABIATO F. (1972). Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemma calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ. Res.* 31: 293
- FERRY D.R.; GOLL A. and GLOSSMANN H. (1983 a). Putative calcium channel molecular weight determinant by target size analysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 323: 292-297.
- FERRY D. R.; GOLL A. and GLOSSMAN H. (1983 b). 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. and GLOSSMAN H. (1983 c). Calcium channels: Evidence for oligomeric nature target size analysis. *EMBO Journal* 2: 1729-1732.
- FERRY D. R.; GOLL A. and GLOSSMAN H (1984). (-)-(³H) Desmethoxyverapamil labelling of putative calcium channels in brain: autoradiographic distribution and allosteric coupling to 1,4-dihydropyridine and diltiazem binding site. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327:183
- FLAIM S. F. and ZELIS R. (1982). Calcium blockers: mechanisms of action and clinical applications. Urban and Schwarzenberg, Baltimore. Cap. 1-8: 3-107

FLAVAHAN N. A.; RIMELE T. J.; COOKE J. P. and VANHOUTE P. M. (1984). Characterization of postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors activated by exogenous nerve-released norepinephrine in the canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 699-705.

FLAVAHAN N. A. and VANHOUTTE P. M. (1986). Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor: Response coupling in canine saphenous and femoral veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238(1): 131-138.

FLAVAHAN N. A.; MILLER V. M.; AARHUS L. L. and VANHOUTTE P. M. (1987). Denervation augments alpha-2 but not alpha-1 adrenergic responses in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 589-593.

FLECKENSTEIN A.; KAMMERMEIER A., DORING A. and FREUND H. J. (1967). Mechanismus neuartiger koronardilatoren mit gleich zeitig Sauerstoff-einsparenden, myokard-effekten, Prenylamin und Iproveratril. *Z. Kreislaufforsch.* 58: 716-744, 839-853.

FLECKENSTEIN A.; TRITTHART H.; FLECKENSTEIN B., HERBST A. and GRÜN G. (1969). Eine neue gruppe kompetitiver Ca^{++} -antagonisten (Iproveratril, D600, prenylamin) mit starken hemmeffekten auf die elektromechanische koppelung in warmblüter-myokard. *Pflügers Arch. Suppl.* 307: R25

FLECKENSTEIN A. (1970). Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the production of myocardial lesions. Hanis P., Ople L. (eds). *Calcium and the heart*. Academic Press: 135-188.

FLECKENSTEIN A. (1983). *Calcium antagonism in heart and smooth muscle*. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

FLECKENSTEIN A. (1985). Calcium antagonist and calcium agonist: fundamental criteria and classification. Bayer-Symposium IX. Cardiovascular effects of DHP-type calcium antagonists and agonists: 3-31.

- FLOREZ J.; ARMIGO J.A. y MEDIAYILLA A. (1987). Farmacología humana. Ed. Eunsa. Cap. 2:21-41.
- FORD L. E. and PODOLSKY R. J. (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 167: 58.
- FOWLER P. J.; GROUS M.; PRICE W. and MATHEWS W. D. (1984). Pharmacological differentiation of post-synaptic alpha-adrenoceptors in the dog saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: 712-718.
- FRANCKOWIACK G.; BECHEM M.; SCHRAMM M. and THOMAS G. (1985). The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on Ca^{++} channels. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 223- 226.
- FRIEDMAN S. M. and ALLARDYCE D. B. (1962). Sodium and tension in artery segment. *Cir. Res.* 11: 84-89.
- FUJI Y.; SUZUKI A.; KATSUMATA A.; NAKAJIMA S. and SARUTA T. (1988). Hormonal and renal responses to oral once-daily calcium entry blocker in normotensive and hypertensive persons. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11: 438-443.
- FURCHGOTT R. R. (1955). The pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 7: 183-265.
- GARFF G.; NAHAS N.; NIKOLOPOULOU M.; NATARAJAN V. and SCHMID H.H.O. (1984). Possible regulation of phospholipase C activity in human platelets by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 299-308.
- GEORGE P. Y. and HELMKAMP G. M. (1985). Purification and characterization of a phosphatidylinositol transfer protein from human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 836: 178-184.
- GHALAYANI A. and EICHERBERG J. (1985). Purification of phosphatidylinositol

synthetase from rat brain by CDP-diacylglycerol affinity chromatography and properties of the purified enzyme. *J. Neurochem.* 44: 175-182.

GLOSSMANN A.; FERRY D. R.; LÜBBECKE F.; MEEVES R. and HOFMANN F. (1982). Calcium channels: direct identification with radioligand binding studies. *TIPS* 431-437.

GLOSSMANN H. and FERRY D. R. (1985). Assay for calcium channels. *Method. Enzymol.* 109: 513

GLOSSMANN A.; FERRY D. R.; GOLL A.; STRIESSING J. and ZERNIG G. (1985). Calcium channels and calcium channel drugs: recent biochemical and biophysical findings. *Drug. Res.* 35 (II) 12a: 1917-1935.

GODFRAIND T. and KABA A. (1969 a). 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. and KABA A. (1969 b). Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 36: 549-560.

GODFRAIND T. and MILLER R. C. (1982). Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor stimulation and Ca-fluxes in isolated rat aorta. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 256: 171-173.

GODFRAIND T.; MILLER R.C. and LIMA J.S. (1982). Selective alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonist-induced contractions and ⁴⁵Ca fluxes in the rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* 77: 597-604.

GODFRAIND T. (1985). *Calcium and Cell Physiology*. Ed. by D. Marmé, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; pp.: 204-226.

GODFRAIND T.; MILLER R. and WIBO M. (1986). Calcium antagonism and calcium

entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38(4): 321-416.

GODFRAIND T. (1987). Classification of calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.* 59: 11B-23B.

GORMAN M. W. and SPARKS H. V. Jr. (1982). Progressive coronary vasoconstriction during relative ischemia in canine myocardium. *Circ. Res.* 51: 411-420.

GONSALVES J.; NUNES J. P.; PAIVA M. Q. and GUIMARAES S. (1988). Loss of selectivity of so-called selective alpha-1 adrenoceptor agonists after phenoxybenzamine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338 (3): 234-238.

GOULD R. M.; SPIVACK W. D.; ROBERTSON D. and POZNANSKY M. J. (1983). Phospholipid synthesis in the squid *Grantaxo*: lizymes of phosphatidylinositol metabolism. *J. Neurochem* 40: 1300-1305.

GRANT J. A. and SCRUTTON M. C. (1979). Novel alpha-2 adrenoceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. *Nature* 277: 659-661.

GUAN Y. Y.; KWAN C. Y. and DANIEL E. E. (1989). Does in vitro activation of postsynaptic alpha-2 adrenoceptor utilize intracellular Ca^{++} for contraction in dog saphenous vein. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 67: 1086-1091.

GUILLETTE G.; BALLA T.; BAUKAL A. J. and CATT K. J. (1987). Inositol 1,4,5-triphosphate binds to a specific receptor and releases microsomal calcium in the anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8196-8199.

GUIMARAES S.; PAIVA M. Q. and MOURA D. (1987). Alpha-2 adrenoceptor-mediated responses to so-called selective alpha-1 adrenoceptor agonists after partial blockade of alpha-1 adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 335: 397-402.

GUYTON A. C. (1988). Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo de calcio y fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En *Tratado de Fisiología Médica*. 7ª Ed.

McGraw-Hill Cap. 79: 928-944.

HAGIWARA S.; FUKUDA J. and EATON D. C. (1974). Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. *J. Gen. Physiol.* 63: 564-578.

HAMILTON C. A.; REID J. L. and SUMNER D. J. (1983). Acute effects of phenoxybenzamine on alpha-adrenoceptor responses in vivo and in vitro; relation of in vivo pressor responses to the number of specific binding sites. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 868-873.

HAN C.; ABEL P. W. and MINNESMAN K. P. (1987). Alpha-1 adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca⁺⁺ in smooth muscle. *Nature* 329: 333-335.

HASHIMOTO M.; SATAKE N.; ITO M.; MASUMURA S. and SHIBATA S. (1989). Potentiating effect of BAY K 8644 on the noradrenaline-induced contraction in rabbit renal and femoral arteries. *Gen. Pharmacol.* 20: 589-594.

HATTORI Y.; NAKAYA H.; TOHSE N. and KANNO M. (1986). Vascular and cardiac effects of a new dihydropyridine derivative, YC-170: A comparison with BAY K 8644. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 670-678.

HIEBLE J. P. and WOODWARD D.F. (1984). Different characteristics of postjunctional alpha-adrenoceptors on arterial and venous smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328: 44-50.

HIEBLE J. P.; DE MARINO R. M.; FOWLER P. J. and MATTHEWS M. D. (1986). Selective alpha-2 adrenoceptor blockade by SK&F 86466. In vitro characterization of receptor selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 90-96.

HIEBLE J. P.; DE MARINO R. M. and MATTHEWS M. D. (1986). Evidence for and against heterogeneity of alpha-1 adrenoceptors. *Life Sci.* 38: 1339-1350.

HILL J. and GETTES L. S. (1980). Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine. *Circ. Res.* 61: 768-778.

HODGKIN A. L. and RUSHTON W. A. H. (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fiber. *Proc. Res. Soc.* B113: 444-479.

HOFMANN F.; NASTAINAZYK W.; RÖHRKASTEN A; SCHVERDER T. and SIEBER M. (1987). Regulation of the L-type calcium channel. *TIPS* 8: 393-398.

HOKIN L. E. and HOKIN M. R. (1955). Effects of acetylcholine on phosphate turnover in phospholipids of brain cortex in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 16: 229-237.

HOKIN L. E. (1985). Receptors phosphoinositide-generated second messengers. *Am. Rev. Biochem.* 54: 205-235.

HOKIN - NEAVERTSON M. (1974). Acetylcholine causes a net decrease in phosphatidylinositol and a net increase in phosphatidic acid in mouse pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 58: 763-768.

HONDEGHEM L.M. and AYAD M.J. (1983). Nifedipine blocks the voltage dependent potentiation of norepinephrine in vascular smooth muscle. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 28:231-233.

HONDEGHEM L. M.; AYAD M. J. and ROBERTSON R. M. (1986). Verapamil, Diltiazem and Nifedipine block the depolarization-induced potentiation of norepinephrine contractions in rabbit aorta and porcine coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239(3): 808-813.

HORN R.; PATLAK J. and STEVENS C. F. (1981). Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 291: 426-427.

HUGTENBURG J. G.; JAP T. J.; MATHY M. J.; VAN HEININGEN P. N.; BOHNENN V. A.; HEIJNIS J. B.; BODDEKE A. W. and VAN ZWIETEN P. A. (1989).

Cardioprotective effect of trimetazidine and nifedipine in guinea-pig hearts subjected to ischaemia. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther* 300: 186-208.

IMAIZUMI Y.; MURAKI K. TAKEDA M. and WATANABE M. (1989). Measurement and simulation of noninactivating Ca^{++} current in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 256: C880-C885.

IRVINE R. F.; LETCHER A. J. and DAWSON R. M. C. (1984). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase and phosphomonoesterase of rat brain. *Biochem. J.* 218: 177-185.

ITO T.; KANMURA Y.; KURIYAMA A. and SUZUKI H. (1984). Nisoldipine-induced relaxation in intact and skinned smooth muscles of rabbit coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 83: 243-258.

ITOT H.; KOHLI J. D. and RAJJER S. I. (1987). Pharmacological characterization of the postsynaptic alpha-adrenoceptors in isolated canine mesenteric arteries and veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 335: 44-49.

JAYAKODY R. L.; SENARATNE M. P. and KAPPAGODA T. (1987). Effects of nifedipine and diltiazem on alpha-adrenoceptor responses in canine saphenous veins. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 269-277.

JERGIL B. and SUNDLER R. (1983). Phosphorylation of phosphatidylinositol in rat liver golgi. *J. Biol. Chem.* 258: 7968-7973.

JIM K. F. and MATTHEWS W. D. (1985). Role of extracellular calcium in contractions produced by activation of postsynaptic alpha-2 adrenoceptors in the canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 234: 161-165.

JIM K. F.; MACIA R. A. and MATTHEWS W. D. (1986). Role of receptor reserve in the inhibition of alpha-1 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium antagonists in the pithed-rat. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 238(1): 89-94.

- JONES L. M. and MICHELL R. A. (1974). Breakdown of phosphatidylinositol provoked by muscarinic cholinergic stimulation of rat parotid-gland fragments. *Biochem. J.* 142: 583-590.
- KARAKI H.; KUBOTA H. and URAKAWA N. (1979). Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 56: 237-245.
- KATZ A. M.; PAPPANO A. J.; MESSINEO F. C.; SMILOWITZ A. and NASH-ADLER P. (1986). Calcium channel blocking Drugs. *The Heart and Cardiovascular System, Cap.* 67: 1597-1611.
- KAWACHI Y.; TOMOIKE H.; MARNOKA Y.; KIKUCHI Y.; ARAKI H., ISHII Y.; TANAKA K. and NAKAMURA M. (1984). Selective hypercontraction caused by ergonovine in the canine coronary artery under conditions of induced atherosclerosis. *Circ. Res.* 69: 441-450.
- KISHI Y. and NUMANO F. (1984). Contractions in normal and atherosclerotic rabbit aortas. *Meish Ageing Dev.* 26: 357-369.
- KOBINGER W. and PICHLER L. (1982). Presynaptic activity of the imidazoline derivative ST 567, a highly selective alpha-1 adrenoceptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 82: 203-206.
- KOMORI K.; FLAVAHAN N. A.; MILLER V. M. and VANHOUTTE P. M. (1990). Electrophysiological analyses of adrenergic neurotransmission and its modulation by chronic denervation in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1197-1201.
- KOSTYUK P. G.; MIRONOV S. L. and SHABA Y. M. (1983). Two ion-selecting filters in the calcium channel of the somatic membrane of mollusc neurons. *J. of Membrane Biology* 78: 83-93.

KOU K.; IBENGWE J.; SUZUKI A. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor antagonists on electrical and mechanical responses of the isolated dog mesenteric vein to perivascular nerve stimulation and exogenous noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 326: 7-13.

KREBS H. A. and HENSELEIT K. Z. (1932). Untersuchungen über die harnstoffbildung in tierkörper, *hoppe-seyler's. Z. J. Phys. Chem.* Ithaca 210, 33.

KUTSKY P. and HESTER R. K. (1986). Ca^{++} -induced aortic contraction in normal K^+ after exposure to Ca^{++} and Mg^{++} free solution. *Eur. J. Pharmacol.* 121: 289-292.

LANDS A. M.; LUDUENA F. P. and BUZZO A. J. (1967 a). Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.* 6: 2241-2249.

LANDS A. M.; ARNOLD A.; McANLIFF J. P.; LUDUENA F. P. and BROWN T. G. Jr. (1967 b). Differentiations of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.

LANGER S. Z. (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* 23: 1973.

LANGER S. Z.; MASSINGHAM R. and SHEPPERSON N. B. (1980). Presence of postsynaptic alpha-2 adrenoceptors of predominantly extrasynaptic location in the vascular smooth muscle of the dog hind-limb. *Clin. Sci. (Oxf)* 59: S225-S228.

LANGER S. Z. (1981). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.* 32: 337-362.

LANGER S. Z. and SHEPPERSON N. B. (1982). Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors and the role of neuronal uptake. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4: S8-S13.

LANGER S. Z. and HICKS P. E. (1984). Alpha-adrenoceptor subtypes in blood vessels: Physiology and pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: S547-S556.

- LANSMAN J. B.; HESS P. and TSIEN R. N. (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd^{++} , Mg^{++} and Ca^{++} . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J. Gen. Physiol.* 88: 321-347.
- LAWSON K. and CAVERO I. (1989). Contractile responses to calcium chloride in rat aortic rings bathed in K^+ -free solution are resistant to organic calcium antagonists. *Br. J. Pharmacol* 96: 17-22.
- LEFER A. M.; WHITNEY III C. C. and HOCK C. E. (1986). Mechanism of the pressor effect of the calcium agonist BAY K 8644 in the intact rat. *Pharmacol.* 32: 181-189.
- LUES I. and SCHÜMANN H. J. (1984). B-HT 920 acts as an alpha-1 adrenoceptor agonist in the rabbit aorta under certain in vitro conditions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 325: 42-46.
- LUNDBERG G. A.; JERGIL B. and SUNDLER R. (1985). Subcellular localization and enzymatic properties of rat liver phosphatidylinositol-4-phosphate Kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 846: 379-387.
- MALAGODI M. H. and CHIOU C. Y. (1974 a). Pharmacological evaluation of a new Ca^{++} antagonist, 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8). Studies in smooth muscles. *Eur. J. Pharmac.* 27: 25-33.
- MALAGODI M. H. and CHIOU C. Y. (1974 b). Pharmacological evaluation of a new Ca^{++} antagonist, 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8). Studies in skeletal muscles. *Pharmacol.* 12: 20-31.
- MARIMOTO S.; KIM S.; FUKUO K.; KOH E.; MORITA R.; KITANO S.; MIYASHITA Y.; IMANAKA S. and OGIHARA T. (1990) Participation of both intracellular free Ca^{++} and protein kinase C in tonic vasoconstriction induced by prostaglandin F2 alpha. *Eur. J. Pharmacol.* 188: 369-378.
- MARTIN W. and GORDON J. L. (1983). Differential calcium dependence of contractile

response and ⁸⁶Rb efflux from the rabbit aorta induced by vasoactive stimuli. *J. Cell. Physiol.* 115:46-52.

MATHY M. J.; THOOLEN M. J. M. C.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1983). Sgd 101/75: cardiovascular effects in various animal preparations; interactions with vascular postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 81: 255-262.

MATTIJS G.; PEETERS T.L. and VANTRAPPEN G. (1988). Effect of different calcium modulators on motilin-induced contractions of the rabbit duodenum. Comparison with acetylcholine. *Regul. Pept.* 21: 321-330.

MCCLESKEY E. W.; FOX A. P.; FELDMAN D. and TSIEN R. W. (1986). Different types of calcium channels. *J. Exp. Biol.* 124: 177-190.

McGRATH J. C. (1982). Evidence for more than one type of alpha-adrenoceptor. *Biochem. Pharmacol.* 31: 467-484.

McGRATH J.C. and O'BRIEN J. W. (1987). Blockade by nifedipine of responses to intravenous bolus injection or infusion of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonists in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 91: 355-365.

MEDGETT I. C. (1985). Alpha-2 adrenoceptors mediate sympathetic vasoconstriction in distal segments of rat artery. *Eur. J. Pharmacol.* 108: 281-287.

MEDGETT I. C. and LANGER S.Z. (1986). Influence of neuronal uptake on the contribution of smooth muscle alpha-2 adrenoceptors to vasoconstrictor responses to noradrenaline in SHR and WKY isolated tail arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332: 43-49.

MEDGETT I. C. and RUFFOLO R. R. (1988). Alpha adrenoceptor-mediated vasoconstriction in rat hindlimb: innervated alpha-2 adrenoceptors in the saphenous arterial bed. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246(1): 249-254.

- MEISHERI K. D.; HWANG O. and VAN BREEMEN C. (1981). Evidence for two separate Ca^{++} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J. Membrane Biol.* 59: 19-25.
- MICHELL R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147.
- MIKKELSEN E. O.; COSTA G. and NYBORG N. C. (1988). Influence of endothelium on the response to calcium agonists, calcium, potassium and noradrenaline in rat aorta. *Pharmacol. Toxicol.* 62: 22-28.
- MILLER R. J. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235: 46-52.
- MOLDEFINGS G. J. and SCHUMANN A. J. (1989). Amplifying effects of several vasoconstrictor agents of alpha-1 adrenoceptor-mediated contraction of isolated thoracic aortae of the guinea pig. *Pharmacol.* 39: 373-382.
- MORELAND S.; USHAY M.P.; KIMBALL S. D.; POWELL J. R. and MORELAND R. S. (1988). Pressor responses induced by BAY K 8644 involve both release of adrenal catecholamines and calcium channel activation. *B.J. Pharmacol* 93: 994-1004.
- MOULDS R. F. W. and STEVENS M. J. (1984). Alpha-adrenergic mechanisms in human peripheral blood vessels. In *the Peripheral Circulation*, ed by S. Hunyor, J. Ludbrook, J. Schawand and M. McGrath pp99-106, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- MULLER R. V. and FRINKELSTEIN H. (1974). The electrostatic basis of Mg^{++} inhibition of transmitter release. *Proc. Nat. Acad. Science* 71: 923-926.
- MULVANY M. J. and VIDEBACK L. M. (1990). Potential sensitivity of calcium channels in micro vessels: functional implications. *Eur. J. Pharmacol* 183 (1): 10.

MURAMATSU I.; OHMURA T.; KIGOSHI S.; HASIMOTO S. and OSHITA M. (1990). Pharmacological subclassification of alpha-1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol* 99: 197-201.

NAITO M. ; HAYASHI T.; KUZUYA M.; FUNAKI C.; ASAI K and KUZUYA F. (1989). Vascular endothelial cell migration in vitro roles of cyclic nucleotides, calcium ion and cytoskeletal system. *Artery* 17: 21-31

NAKANISHI H.; NOMURA H.; KIKKAWA U. ; KISHIMOTO A. and NISHIZUKA Y. (1985). Rat brain and liver soluble phospholipase C: resolution of two forms with different requirements for calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 132: 582-590.

NAYLER W. G. and DILLON J. S. (1986). Calcium antagonists and their mode of action: an historical overview. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 21: 975-1075.

NAYLER W. G. (1988). *Antagonistas del Calcio*. Ed. Springer-Verlag. Cap. 11-17: 157-260.

NICHOLS A. J. and RUFFOLO R. R. Jr. (1986). The relationship between alterations in alpha-1 adrenoceptor reserve by phenoxybenzamine and benextramine and the sensitivity of cirazoline-induced pressor responses to inhibition by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 126: 297-301.

NILJUS B.; HESS P.; LANSMAN J. B. and TSIEN R. W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316: 443-446.

NISHIZUKA Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature (Lond)* 334: 661-665.

NOWYCKY M.; FOX A. P.; TSIEN R. N. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440-443.

OLIVERA B. M.; McINTOSH J. M.; CRUZ L. J.; LUQUE F. A. and CERAY W. R.

- (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from "Conus geographus" venom. *Biochem. N. Y.* 23: 5087-5090.
- OWEN N.E. and RIDGE K.M. (1989). Mechanism of angiotensin II stimulation of Na-K-Cl cotransport of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 257(4): C629-C636
- PAOLETTI R. and GOVONIS (1987). Classification of calcium antagonist: proposal of the who committee. *Pharmacol. Res. Com.* 19(3): 195-208.
- PAPASANNOU S.; PANZA-KNODLE S. and YOUNG P. C. (1989). Calcium uptake studies of 1,4-dihydropyridine agonists into rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sci* 44: 1751-1758.
- PARRIER G. S. and HOKIN-NEAVERSON M. (1984). Phosphatidylinositol synthase from canine pancreas: solubilization by n-octyl glucopyranoside and stabilization by manganese. *Biochem.* 23: 4785-4791.
- PLANTAVID M.; ROSSIGNOL L.; CHAP A. and DOUSTE-BLAZY L. (1986). Studies of endogenous polyphosphoinositide hydrolysis in human platelet membranes. Evidence that polyphosphoinositides remain inaccessible to phosphodiesterase in the native membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 875: 147-156.
- RANA R. S. and HOKIN L. E. (1990). Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70(1): 115-164.
- RANDRIANTSOA A.; HEITZ C.; STODET J. C. (1981). Functional characterization of postjunctional alpha-adrenoceptors in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 75: 57-60.
- REID J. L. (1981). The clinical pharmacology of clonidine and related central antihypertensive agents. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12: 295-302.
- REID J. L.; HAMILTON C. A. and HANNAH J.A.M. (1983). Peripheral alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor mechanisms in blood pressure control. *Chest.* 83: 302-304.

RENTER H.; STEVENS C. F.; TSIEN R. N. and YELLEN G. (1982). Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature* 297: 501-504.

RENTER H.; PORZIG A.; KOKUBUN S. and PROD'HOM B. (1985) 1-4 dihydropyridines as tools in the study of Ca^{++} channels. *TINS*. September: 396-400.

RHODES K. F. and WATERFALL Y. F. (1987). The effects of some alpha-adrenoceptor antagonists on the responses of the canine saphenous vein to B-HT 933, UK-14304 and methoxamine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 335: 261-268.

RICHER C.; LEFEVRE-BORG F.; LECHAIRE J.; GOMENI C.; JOMENI R.; GIVDICELU J. and CaVERO I. (1987). Systemic and regional hemodynamic characterization of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonists in pithed-rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240(3): 944-953.

RINGER S. (1982). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricular contraction. *J. Physiol.* IV: 29-42, 222-225.

ROMERO J.C.; RAIG L.; GRANGER J.P.; RUILOPE L.M. AND RODICIO J.L. (1987). Multiple effects of calcium entry blockers on renal function in hypertension. *Hypertension* 10: 140-151

ROUGIER O.; VOSSORT G.; GARNIER D.; GARGONIL Y. M. and CORABOENF E. (1969). Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflügers Arch.* 308: 91-110.

RÜEGG U. (1988). El transporte de calcio a través de las membranas. *Sandorama* 1988: 23-28.

RUFF R. L. (1986). Ionic channels II: Voltage and agonist gated and agonist modified

channel properties and structure. *Muscle & Nerve* 9: 767-786.

RUFFOLO R. R.; YADEN E. L. and WADDELL J. E. (1980). Receptor interactions of imidazolines. V. clonidine differentiates postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes in tissues from the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 557-561.

RUFFOLO R. R.; WADDELL J. E. and YADEN E. L. (1981). Postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of alpha-2 adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 235-240.

RUFFOLO R. R.; WADDELL J. E. and YADEN E. L. (1982). Heterogeneity of postsynaptic alpha-adrenergic receptors in mammalian aortas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 309-314.

RUFFOLO R. R. and YADEN E. L. (1984). Existence of spare-adrenoceptors but not alpha-2 adrenoceptors for respective vasopressor effects of cirazoline and B-HT 920 in the pithed-rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 1011-1019.

RUFFOLO R.R.; MORGAN E. L. and MESSICKK (1984). Possible relationship between receptor reserve and the differential antagonism of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium channel antagonists in the pithed-rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 587-594.

RUILOPE L. M.; MIRANDA B.; GARCIA ROBLES R.; BIGORRA J.; OLIET A.; ALCAZAR J. M.; SANCHO ROF J. and RODICIO J. L. (1989). Effects of nisoldipine on renal function in normal volunteers and essential hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 13: 90- 93.

RUILOPE L. M. (1990). Utilización de los antagonistas del calcio en el tratamiento de la hipertensión arterial. *Medicine V n° extraordinario*: 22-25.

SAIDA K. (1981). Ca^{++} -and "depolarization"-induced Ca^{++} release in skinned smooth

muscle fibers. Biomedical Res. 2: 453.

SAIDA K. and NONOMURA Y. (1981). Characteristics of Ca^{++} release in skinned smooth muscle fibers. Biomedical Res. 2: 453.

SAIDA K. (1982). Intracellular Ca^{++} release in skinned smooth muscle. J. Gen. Physiol. 80: 191.

SAIDA K. and VAN BREEMEN C. (1983). Mechanism of Ca^{++} antagonist-induced vasodilation. Intracellular actions. Cir. Res. 52: 137-142.

SAIDA K. and VAN BREEMEN C. (1984 a). Characteristics of the norepinephrine-sensitive Ca^{++} store in vascular smooth muscle. Blood Vessels 21:43.

SAIDA K. and VAN BREEMEN C. (1984 b). Cyclic AMP modulation of adrenoceptor mediated arterial smooth muscle contraction. J. Gen. Physiol 84: 307.

SASTRY B. V. R. and LASSLO (1958). Aliphatic reserpine analogs. J. Org. Chem. 23: 1577.

SCRIABINE A.; ANDERSON C. L. and JANIS R. A. (1986). BAY K 8644 induced enhancement of ^{45}Ca uptake by rabbit aortic rings. J. Cardio. Pharmacol. 8(4): 665-669.

SCHWARTZ A. (1987). Studies on mechanisms of calcium channel modulators. J. Mol. Cell. Cardiol. 19 (S.II): 49-62.

SCHOEMAKER M. and LANGER S. Z. (1985). (3H) diltiazem binding to calcium channel antagonists recognition sites in rat cerebral cortex. Eur. J. Pharmacol. 111(2): 273-277.

SCHRAMM M.; THOMAS G.; TOWART R. and FRANCKOWIAK G. (1983 a). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{++} channels.

Nature 303: 535-537.

SCHRAMM M.; THOMAS G.; TOWART R. and FRANCKOWIAK G. (1983 b). Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. *Arz. Forsh.* 33: 1268-1272

SCHRAMM M.; TOWART R.; KAZDA S.; THOMAS G. and FRANCKOWIAK G. (1985 a). Calcium agonism, a new mechanism for positive inotropy. Hemodynamic effects and mode of action of BAY K 8644. *Myocardiol.* 6: 59-70.

SCHRAMM M.; TOWART R.; LAMP B and THOMAS G. (1985 b). Modulation of calcium ion influx by the 1,4-Dihydropyridines Nifedipine and BAY K 8644. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 7: 493-496.

SCHRAMM M.; BECHEM M.; FRANCKOWIAK G.; THOMAS G. and TOWART R. (1986). Calcium antagonist and calcium agonist drugs. Ion channels in Neuronal Membranes.: 213-225.

SCHWARTZ A.; GRUPP I.L.; GRUPP G.; WILLIAMS J.S.; and VAGHY P.L. (1984). Effects of dihydropyridines calcium channel modulators in the heart: pharmacological and radioligand binding correlations. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 125: 387-394.

SCRIABINE A.; ANDERSON C. L. and JANIS R. A. (1986). BAY K 8644- induced enhancement of ^{45}Ca uptake by rabbit aortic rings. *J. Cardio. Pharmacol.* 8(4): 665-669

SHARPE A. G. (1988). *Química Inorgánica*. Ed. Reverté S.A. Pag. Cap.5: 168-190.

SHEARMAN M. S.; SEKIGUCHI K. and NISHIZUKA J. (1989). Modulation of ion channel activity: A key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacol. Rev.* 41(2): 211-237.

SHEPPERSON N. B. and LANGER S. Z. (1981). The effects of the

2-amino-tetrahydronaphthalen derivative M7, a selective alpha-2 adrenoceptor agonist in vitro. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 318: 10-13.

SHEPPERSON N. B.; DUVAL N.; NASSINGHAM R. and LANGER S. Z. (1982). Differential blocking effects of several dopamine receptor autafonists for peripheral pre-and postsynaptic dopamine receptors in the anesthetized dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 221(3): 753-761.

SHERMAN W. R.; LEAVITT A. L.; HONCHAR M.P.; HALLCHER L. M. and PHILLIPS B. E. (1981). Evidence that lithium alters phosphoinositide metabolism. Chronic administration elevates primary D-myo-inositol-1-phosphate in cerebral cortex of the rat. J. Neurochem 36: 1947-1951.

SHIPLEY R. E. and TILDEN J. A. (1947). A pithed-rat preparation suitable for assaying pressor substances. Proc. Soc. Exp. Biology and Medicine 64(1): 453-455.

SILVER P. J. and STULL J. T. (1982 a). El papel del Calcio en la contracción del músculo liso vascular. En: Bloqueadores del calcio. Mecanismos de acción y aplicaciones clínicas. Flain S. F. y Zelis R. Ed. Urban and Schwarzenberg. Cap. 3:37-52.

SILVER P. J. and STULL J. T. (1982 b). Regulation of myosin light chain and phosphorylase phosphorylation in tracheal smooth muscle. J. Biol. Chem 257: 6145-6150.

SINGER S. J. and NICOLSON G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cel membranes. Science 175: 720.

SMITH C. D. and WELLS W. W. (1983). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. J. Bio. Chem. 258: 9368-9373.

SMITH J. M. and JONES A. W. (1985). Calcium-dependent fluxes of 42-potassium and 36-chloride during norepinephrine activation of rat aorta. Circ. Res. 56: 507-516.

- SOMERHARJU P.; PARIDON P. V. and WIRTZ K. W. A. (1983). Phosphatidylinositol transfer protein from bovine brain, substrate specificity, and membrane binding properties. *Biochim. Biophys Acta* 731: 186-195.
- SOMLYO A. P.; DEVINE C. E.; SOMLYO A. V. and NORTH S. R. (1971). Sarcoplasmic reticulum and temperature-dependent contraction of smooth muscle in calcium-free solutions. *J. Cell Biol.* 61: 722.
- SOMLYO A. P.; SOMLYO A. V.; SHUMAN H. and ENDO M. (1982). Calcium and monovalent ions in smooth muscle. *Fed. Proc.* 41: 2882.
- SPAT A.; BRADFORD P. G.; MCKINNEY J. S.; RUBIN R. P. and PUTNEY J. W. (1986). A saturable receptor for ^3H -inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature (Lond)* 319: 514-516.
- SPEEDING M. and CAVERO I (1984). Calcium antagonists: A class of drugs with a bright future. Determination of basic pharmacological properties. *Life Sciences* 35: 575-587.
- SPEEDING M. (1987). Three types of Ca^{++} channels explain discrepancies. *Trends in Pharmacol.Sciences* 8: 115-117.
- STANFIELD P. R. (1986). Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *British Medical Bulletin*, 42(4):359-367.
- STARKE K. (1981). Alpha-adrenoceptor subclassification. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 88: 199-236.
- STEVENS M. J. and MOULDS R. F. W. (1985). Neuronally-released norepinephrine does not preferentially activate postjunctional alpha-adrenoceptors in human blood vessels in vitro. *Circ. Res.* 57:399-406.
- STEVENS M. J. and MOULDS R. F. W. (1986). Antagonism by nifedipine of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor mediated responses of human digital arteries. *J. Pharmacol*

Exp. Ther. 236: 764-769.

STOREY D. J.; SHEARS S. B.; KIRK C. J. and MICHELL R. A. (1984) Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate to inositol in liver. *Nature (Lond)* 312: 374-376.

STREB A.; IRVINE R. F.; BERRIDGE M. J. and SCHULZ I. (1983). Release of Ca^{++} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature (Lond.)* 306: 67-69.

STULL J. T.; BLUMENTHAL D. K.; MILLER J. R. and DISALVO J. (1982). Regulation of myosin phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14 (S.3P): 105-110

SU C. M.; SWAMY V. C. and TRIGGLE D. J. (1984). Calcium channel activation in vascular smooth muscle by BAY K 8644. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62(11): 1401-1410.

SULLIVAN A. T. and DREW G. M. (1980). Pharmacological characterization of pre- and postsynaptic alpha-adrenoceptors in dog saphenous vein. *Maunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 314: 249-258.

SULPILZIO A. and HIEBLE J. P. (1987). Demonstration of alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction in the isolated canine saphenous artery treated with BAY K 8644. *Eur. J. Pharmacol.* 135:107-110.

TAKAY T.; NODA M.; MISHINA M.; SHIMIZU S.; FURATONI Y.; KAYANO T.; IKEDA T.; KUBO T.; TAKAHASHI A.; TAKAHASHI T.; KUNO M. and NUMA S. (1985). Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 315: 761-764.

TAMARGO J. (1986). Estado actual y fronteras de los antagonistas del calcio. *Rev. Esp. Cardiol.* 39(6): 397-400.

- TAMARGO J. y DELGADO C. (1987). Bloqueantes de los canales del calcio. En: Farmacología y su proyección a la clínica. B. Lorenzo Velazquez. 15ª Ed. Cap. 40:489-499.
- TANABE T.; TAKESHIMA H.; MIKAMI A.; FLOCKERZI V.; TAKAHASHI H.; KANGAWA K.; KOJIMA M.; MATSNO H.; HIROSE T. and NUMA S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature (Lond)*. 328: 313-318.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1980). Postsynaptic alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the circulatory system of the pithed rat; selective stimulation of the alpha-2 type by B-HT 920. *Eur. J. Pharmacol.* 63: 199-202.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN (1981). The postsynaptic alpha-2 adrenoceptor. *J. Auton. Pharmacol.* 1: 171-183.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1982). Alpha-2 adrenoceptors classification, localization, mechanisms and targets for drugs. *J. Med. Chem.* 25: 1369-1401.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; VAN MEEL J. C. A.; DE JONGE A.; MATHY M. J. and VAN ZWIETEN P. A. (1983 a). Influence of nifedipine on functional responses in vivo initiated at alpha-2 adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 1-6.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; MATHY M. J.; WILFFERT B.; KALKMAN A. O.; THOOLEN M. J. M. C.; DE JONGE A.; VAN MEEL J. C. A. and VAN ZWIETEN P. A. (1983 b). Differential effect of calcium entry blockers on alpha-1 adrenoceptor-mediated vasoconstriction in vivo. *Arch. Pharmacol.* 324: 239-245.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; THOOLEN M. J. M. C.; MATHY M. J.; WILFFERT B.; DE JONGE A. and VAN ZWIETEN P. A. (1983 c). Sgd 101/75 is distinguished from other selective alpha-1 adrenoceptor agonists by the inhibition of its pressor responses by calcium blockade and vasodilation in pithed rats and cats. *Eur. J.*

Pharmacol. 96: 187-192.

TIMMERMANS P. B. M. W. M.; MATHY M. J.; THOOLEN M. J. M. C.; DE JONGE A.; WILFFERT B. and VAN ZWIETEN (1984). Invariable susceptibility to blockade by nifedipine of vasoconstriction to various alpha-2 adrenoceptor agonists in pithed-rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 772-775.

TIMMERMANS P. B. M. W. M.; THOOLEN M. J. M. C.; MATHY M. J.; WILFFERT B.; DE JONGE A. and VAN ZWIETEN P. A. (1985). Effects of the irreversible alpha-adrenoceptors antagonists phenoxybenzamine and benextramine on the effectiveness of nifedipine in inhibiting alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction in pithed-rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 329: 404-4134.

TIMMERMANS P. B. M. W. M.; BECKERINGH J. J.; VAN ZWIETEN P. A. and THOOLEN M. J. M. C. (1987 a). Sensivity of alpha-1 adrenoceptor-mediated pressor responses to inhibition by Ca⁺⁺ entry blockers in the pithed-rat: arguments against the role of receptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240(3): 884-870.

TIMMERMANS P. B. M. W. M.; CHIU A. T. and THOOLEN M. J. M. C. (1987 b). Calcium handling in vasoconstriction to stimulation of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 1649-1657.

TIMMERMANS P. B. M. W. M. and THOOLEN M. J. M. C. (1987). Equal potency of nifedipine to inhibit alpha-1 (dobutamine and BDF 6143) and alpha-2 adrenoceptor (B-HT 920) induced pressor responses in pithed rats; lack of effect of phenoxybenzamine. *Eur. J. Pharmac.* 140: 133-142.

TOWART R. and SCHRAMM M. (1985). Calcium channel modulators and calcium channels. *Biochem. Soc. Symp.* 5^o: 81-95.

TRIGGLE D. J. (1982). *Farmacología Bloquímica de los Bloqueantes del Calcio. Bloqueadores del Calcio: Fialm S. F. y Zelis R. Ed.ENE. Cap.9: 121-135.*

TRIGGLE D. J. and JANIS R. A. (1984). The 1-4 DHP receptor: A regulatory component of the Ca^{++} channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6(S.7): 949-955.

TRIGGLE D.J.; SKATTEBOL A.; RAMPE D.; JOSLYN A. and GENGO P. (1986) Chemical pharmacology of Ca^{++} channel ligands. *New Insights into cell and Membrane Processes*. Ed. Poste: 125-143.

TRIGGLE D. J. (1987) Calcium channel drugs: antagonists and activators. *Isi Atlas of Science: Pharmacology*: 319-324.

TRIGGLE D. J. and JANIS R. A. (1987). Calcium channel ligands. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27: 347-369.

VAGHY P. L.; WILLIAMS J. S. and SCHWARTZ A. (1987). Receptor pharmacology of calcium entry blocking agents. *Am. J. Cardiol.* 59: 9-17.

VALLET B.; MOLLA A. and DEMAILLE J. (1981). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of purified bovine aortic calcium/calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *Biochim. Biophys Acta* 674: 256-264.

VALLOTTON M. (1985). Metabolismo fosforocálcico: parathormona, calcitonina y vitamina D. En: *Fisiología Humana*. Meyer P. Ed. Salvat. Cap. 6:393-407.

VAN BREEMEN C.; FARINAS B. R.; GERBA P. and McNAUGHTON D. (1972). Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Circ. Res.* 30: 44-54.

VAN BREEMEN C. and SIEGEL B. (1980). The mechanism of alpha-adrenergic activation of the dog coronary artery. *Circ. Res.* 46: 426-429.

VAN BREEMEN C.; HWANG K.; LONTZENHISER R.; LUKEMAN S. and YAMAMOTO A. (1985). Ca^{++} entry intravascular smooth muscle. *Bayer-Symposium IX Cardiovascular*

Effects of Dihydropyridine-Type. Calcium Antagonists and Agonists: 58-71.

VAN BREEMEN C.; CAUVIN C.; LEYTEN P.; LODGE N. and SAIDA K. (1986). Regulation of cytoplasmic Ca^{2+} in vascular smooth muscle in recent advances in arterial diseases: atherosclerosis, hypertension and vasospasm. *Progress in Clinical and Biological Research* 219: 157-168.

VAN DONGEN C. J.; KOK J. W.; SCHRAMA L. H.; OESTREICHER A. B. and GISPEN W. H. (1986). Immunohistochemical characterization of phosphatidylinositol 4-phosphate kinase from rat brain. *Biochem. J.* 233: 859-864.

VAN HEININGEN P. N.; BOHNEN V. A. and VAN ZWIETEN P. A. (1989). Calcium dependency of the angiotensin II-induced vasoconstriction in the rat. *J. Hypertens.* 7: S158-S159.

VANHOUTTE P. M. (1982). Heterogeneity of postjunctional vascular alpha-adrenoceptors and handling of calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4: 591-596.

VANHOUTTE P. M. and RIMELE T. J. (1982). Calcium and alpha-adrenoceptors in activation of smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4: S280-S286.

VANHOUTTE P. M. and PAOLETTI R. (1987). The WHO classification of calcium antagonists. *TIPS* 8: 4-5.

VAN MEEL J. C. A.; DE JONGE A.; WILFFERT B.; KALKMAN H. O.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1981 a). Vascular smooth muscle contraction initiated by postsynaptic alpha-2 adrenoceptor activation is induced by an influx of extracellular calcium. *Eur. J. Pharmacol.* 69:205-208.

VAN MEEL J. C. A.; DE JONGE A.; WILFFERT B.; KALKMAN H. O.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1981 b). Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic alpha-2 adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316: 288-293.

- VAN MEEL J. C. A.; DE JONGE A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1981 c). Selectivity of some alpha-adrenoceptor agonists for peripheral alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the normotensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 760-767.
- VAN MEEL J. C. A.; WILFFERT B.; DE ZOETEN K.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1982). The inhibitory effect of newer calcium antagonists (nimodipine and PY-408-068) on vasoconstriction *in vivo* mediated by postsynaptic alpha-2 adrenoceptors. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* 260: 206-217.
- VAN MEEL J. C. A.; TOWART R.; KAZDA S.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1983). Correlation between the inhibitory activities of calcium entry blockers on vascular smooth muscle constriction *in vitro* after K-depolarization and *in vivo* after alpha-2 adrenoceptor stimulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 322: 34-37.
- VAN ROOIJEN L. A. A.; ROSSOWSKA M. and BAZAN N. G. (1985). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by its product phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 126: 150-155.
- VAN ZWIETEN P. A.; VAN MEEL J. C. A. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1982). Calcium antagonists and alpha-2 adrenoceptors: Possible role of extracellular ions in alpha-2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4 (3): S273-S279.
- VAN ZWIETEN P. A. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1984). Central and peripheral alpha-adrenoceptors. Pharmacological aspects and clinical potential. *Advances in Drug Research* 13: 209-254.
- VAN ZWIETEN P. A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and BRUMMELEN P. (1984). Role of alpha-adrenoceptors in hypertension and in antihypertensive drug treatment. *Am J. Medicine* 5: 17-25.

VAN ZWIETEN P. A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M.; THOOLEN M. J. M. C.; WILFFERT B. and DE JONGE A. (1985). Calcium dependency of vasoconstriction mediated by alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (6): S113-S120.

VAN ZWIETEN P. A. (1986). Interaction between alpha and beta-adrenoceptor mediated cardiovascular effects. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8 (4): S21-S28.

VAN ZWIETEN P. A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN HEININGEN P. N. M. (1987). Receptor subtypes involved in the action of calcium antagonists. *J. Hypertension* 5: S21-S28.

VAN ZWIETEN P.A. (1989). Pharmacologic profile of urapidil. *Am. J. Cardiol.* 64: 1D-6D.

VENTER J. C.; FRASER C. M.; SCHABER J. S.; JUNG C. Y.; BOLGER G. and TRIGGLE D. J. (1983). Molecular properties of the slow inward calcium channel. *J. Biol. Chem.* 258: 9344-9348.

WAGNER J. A.; REYNOLDS I. J. and SNYDER S. A. (1987). Physiological and Pharmacological correlates of calcium antagonist receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10 (10): S1-S9.

WALLEY T. J.; HEAGERTY A. M.; WOODS K. L.; BING R. F.; POHL J. E. and BARNETT D. B. (1988). The haemodynamic effects of intravenous nifedipine in normotensive and hypertensive subjects. *J. Hypertens.* 2: 199-202.

WANSTALL J. C. and O'DONNELL S. R. (1989). Age influences responses of rat isolated aorta and pulmonary artery to the calcium channel agonists, BAY K 8644, and to potassium and calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13: 709-714.

WEISS J. and SHINE K. I. (1982). Extracellular K⁺ accumulation during myocardial ischemia in isolated rabbit heart. *Am. J. Physiol.* 242: H619-H628.

- WIBO M.; DEROTH L. and GODFRAIND T. (1988). Pharmacologic relevance of dihydropyridine binding sites in membranes from rat aorta: kinetic and equilibrium studies. *Circ. Res.* 62: 91-96.
- WILFFERT B.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1982). Extrasynaptic location of alpha-2 and non innervated beta-2 adrenoceptors in the vascular system of the pithed normotensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 762-768.
- WILFFERT B.; VAN HEININGEN P. N. M.; MATHY M. J.; BATINK H. D.; DE JONGE A.; THOOLEN M. J. M. C.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1984 a). Lack of relationship between intrinsic activity and susceptibility of pressor responses to blockade by nifedipine among the alpha-2 adrenoceptor agonists B-HT 920 and B-HT 950. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327:90-92
- WILFFERT B.; VAN HEININGEN P. N. M.; MATHY M. J.; DE JONGE A.; THOOLEN M. J. M. C.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1984 b). Interactions between the putative calcium entry promotor BAY K 8644 and pressor responses produced by alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonists in the pithed normotensive rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328: 76-82.
- WILSON D. B.; BROSS T. E.; HOFMANN S. L. and MAFERNS P. W. (1984). Hydrolysis of polyphosphoinositides by purified sheep seminal vesicle phospholipase C enzymes. *J. Biol.Chem.* 259: 11718-11724.
- WINKLER M. A.; DEWITT L. M. and CHEUNG W. Y. (1987). Calmodulin and calcium channel blockers. *Hypertension* 9: 217-223.
- WINSLOW E.; FARMER S.; MARTORANA M. and MARSHALL R. J. (1986). The effects of bepridil compared with calcium antagonists on rat and rabbit aorta. *Eur. J. Pharmac.* 131: 219-228.
- WONG P. C.; PRICE W. A. Jr.; CHIU A. T.; THOOLEN M. J.; DUNCIA J. V.; JOHNSON A. L. and TIMMERMANS P. B. (1989 a). Nonpeptide angiotensin II receptor

antagonists. IV. EXP 6155 and EXP 6803. *Hypertension* 13: 489-497.

WONG P. C.; REILLY T. M. and TIMMERMANS P. B. (1989 b). Effect of a monoclonal antibody to angiotensin II on hemodynamic responses to noradrenergic stimulation in pithed rats. *Hypertension* 14: 488-497.

WONG P. C.; PRICE W. A.; CHIU A. T.; DUNCIA J. V.; CARINI D. J.; WEXLER R.R.; JOHNSON A. L. and TIMMERMANS P. B. (1990). Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DUP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 252: 719-725.

YAARI Y.; HAMON B. and LUX H. D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235: 680-682.

YAMAGUCHI I and KOPIN I. J. (1980). Differential inhibition of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated pressor responses in pithed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214: 275-281.

YAMAMOTO H.; HWANG O.K. and VAN BREEMEN (1984). BAY K 8644 differentiates between potential and receptor operated Ca^{++} channels. *Eur. J. Pharmacol.* 102: 555-557.

FE DE ERRATAS

Página 65, línea 5*:

Donde dice "estimularía de IP_3 "

Debe decir "estimularía la formación de derivados de IP_3 "

Página 191 comienzo de página:

Falta "Cabe pensar que con el bloqueo de la fuente"

Falta en Bibliografía:

GUILLESPIE, J.S. and MUIE; T.C. (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed-rat. Br.J.Pharmacol. Chemother. 30: 78-87.

GUILLESPIE, J.S., MACLAREN, A. and POLLOCK, D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. Br.J.Pharmacol. 257-267.