

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**PRESIÓN ARTERIAL Y REACTIVIDAD VASCULAR DE
RATAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON
SUPLEMENTOS DIETÉTICOS DE CALCIO Y/O
AMLODIPINO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Beatriz Civantos Calzada**

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2007-2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**PRESION ARTERIAL Y REACTIVIDAD
VASCULAR EN RATAS TRATADAS
CRONICAMENTE CON SUPLEMENTOS
DIETETICOS DE CALCIO Y/O AMLODIPINO**

TESIS DOCTORAL

**BEATRIZ CIVANTOS CALZADA
MADRID 2001**

BEATRIZ CIVANTOS CALZADA

**PRESION ARTERIAL Y REACTIVIDAD
VASCULAR EN RATAS TRATADAS
CRONICAMENTE CON SUPLEMENTOS
DIETETICOS DE CALCIO Y/O AMLODIPINO**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
2001

INDICE

Página

ABREVIATURAS	1
1.- INTRODUCCION	3
1.1.- Receptores α adrenérgicos	4
1.1.1.- Primeros conceptos.....	4
1.1.2.- Clasificación, distribución y función.....	5
1.1.3.- Subtipos.....	28
<i>Caracterización de los subtipos del receptor α_1 adrenérgico</i>	28
<i>Caracterización de los subtipos del receptor α_2 adrenérgico</i>	38
1.1.4.- Estructura.....	46
<i>Estructura del receptor α_1 adrenérgico</i>	46
<i>Estructura del receptor α_2 adrenérgico</i>	48
1.1.5.- Mecanismos de transducción de la señal.....	49
<i>Transducción del estímulo α_1 adrenérgico</i>	51
<i>Transducción del estímulo α_2 adrenérgico</i>	59
1.2.- Características del amlodipino como antagonista del calcio	67
2.- ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS	72
2.1.- Antecedentes	73
2.2.- Hipótesis	86
2.3.- Objetivos	86
3.- MATERIAL Y METODOS	88
3.1.- Protocolos experimentales	89
3.1.1.- Protocolo del Estudio nº 1.....	89
3.1.2.- Protocolo del Estudio nº 2.....	93
3.2.- Composición y características de las dietas	96
3.3.- Medidas de presión arterial-Método del manguito en la cola	97
3.4.- Ensayos en la preparación de “pithed rat”	98
3.5.- Determinación de la calcemia	101
3.6.- Fármacos utilizados	102
3.7.- Tratamiento estadístico de los datos	103

4.- RESULTADOS	105
4.1.- Resultados del estudio nº 1	106
4.1.1.- Desarrollo e ingesta de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.....	106
4.1.2.- Presión arterial de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.....	110
4.1.3.- Calcemia de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.....	116
4.1.4.- Reactividad vascular de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.....	119
4.2.- Resultados del estudio nº 2	145
4.2.1.- Desarrollo e ingesta de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino, o no recibían tratamiento farmacológico.....	145
4.2.2.- Presión arterial y frecuencia cardíaca, de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino, o no recibían tratamiento farmacológico.....	149
4.2.3.- Calcemia de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.....	157
4.2.4.- Reactividad vascular de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.....	161
5.- DISCUSION	176
6.- CONCLUSIONES	214
7.- BIBLIOGRAFIA	216

ABREVIATURAS:

Ad: adrenalina
ADP: adenosín difosfato cíclico
AMPc: adenosín monofosfato cíclico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosín trifosfato
°C: grado centígrado
C: región C-terminal
CC: corteza cerebral
CEC: cloroetilclonidina
CGRP: péptido relacionado genéticamente con la calcitonina
cm: centímetro
CMLV: células del músculo liso vascular
DAG: diacilglicerol
EDRF: factor relajante derivado del endotelio
EDTA: etilen diamino tetracetato
Fc: frecuencia cardíaca
FHP: factor hipertensivo paratiroideo
g: ges
g: gramos
GMPc: guanosín monofosfato cíclico
HA: humor acuoso
HTA: hipertensión arterial
i.c.v.: intracerebroventricular
i.p.: intraperitoneal
IP₃: inositol- 1,4,5-trifosfato
i.v.: intravenosa
Kd: kilodaltons
kg: kilogramos
L: litro
M: molar
mg: miligramos
mL: mililitros
mm: milímetro
mm Hg: milímetros de mercurio
mM: milimolar
N: región N-terminal
NA: noradrenalina
ng: nanogramos
NO: óxido nítrico
µg: microgramos
µM: micromolar
MSH: hormona estimulante de los melanocitos
PI: fosfatidilinositol
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLA₂: fosfolipasa A₂
PLC: fosfolipasa C
PLD: fosfolipasa D
PA: ácido fosfatídico
PA: presión arterial
PAD: presión arterial diastólica
PAS: presión arterial sistólica
PGE₂: prostaglandina E₂
PKA: proteín-kinasa A

PKC: proteín-kinasa C
Pm: peso molecular
PP: presión de pulso o presión arterial diferencial
PT: proteínas totales
PTH: parathormona
r.p.m.: revoluciones por minuto
RS: retículo sarcoplásmico
SDR: ratas Sprague-Dawley
seg: segundo
SHR: ratas espontáneamente hipertensas
SNC: sistema nervioso central
WKY: Wistar Kyoto

1.- INTRODUCCION

La información sobre los receptores α vasculares y sobre el antagonista del calcio que incluimos en esta Introducción, puede ser útil como soporte para la lectura de esta Tesis Doctoral. Sin embargo creemos que la información que aparece en el apartado de Antecedentes, Hipótesis y Objetivos podría ser en sí mismo suficiente para su comprensión en la mayoría de los casos.

1.1.- Receptores α adrenérgicos

1.1.1.- Primeros conceptos

Los receptores adrenérgicos son receptores de membrana que se localizan tanto en el tejido neuronal como en tejidos no neuronales. Son los encargados de mediar las respuestas a las catecolaminas endógenas noradrenalina (NA) y adrenalina (Ad). La NA se libera desde las terminaciones nerviosas noradrenérgicas postganglionares, y ambas catecolaminas, NA y Ad, se secretan en la médula adrenal. Estos compuestos se encargan de controlar, entre otras, funciones tan importantes como la función cardiovascular, la función respiratoria, la función neuronal, la digestión, la contracción y la dilatación de la pupila, el metabolismo energético y la función endocrina. Por ello, los receptores adrenérgicos, a través de los cuales actúan, constituyen dianas de elevada importancia terapéutica para el tratamiento de distintas afecciones. La modulación del tono vascular actuando sobre los receptores α adrenérgicos, de los que nos ocuparemos en esta Introducción, permite concretamente controlar una enfermedad sumamente importante por su prevalencia y repercusión clínica, la hipertensión arterial (HTA).

Distintos estudios han permitido el conocimiento actual de los receptores adrenérgicos y han facilitado su clasificación. Originalmente Cannon y Rosenblueth en 1937 propusieron una hipótesis basada en la existencia de dos neurotransmisores o mediadores endógenos en el organismo, a los que se podían atribuir las distintas respuestas, tanto excitadoras como inhibitorias, observadas tras la activación de los receptores adrenérgicos. Para estos investigadores la “Simpatina E” era el mediador responsable de las respuestas excitadoras, y la “Simpatina I” era el mediador responsable de las respuestas inhibitorias (Cannon y Rosenblueth, 1937). Los primeros intentos para clasificar en distintas poblaciones a los receptores adrenérgicos se remontan sin embargo a 1948. Hasta entonces los datos que se manejaban eran escasos y muy pobres, y no permitían establecer una clasificación de estos receptores. Ahlquist en 1948, fue el primero en utilizar aminas simpaticomiméticas sintéticas que tenían una estrecha relación estructural con la Ad, y llevó a cabo un estudio para evaluar su potencia en distintos órganos. Así, encontró que un grupo de estas aminas poseía un rango de potencia común para controlar una serie de funciones en el organismo, y estableció que

este conjunto de funciones estarían mediados por un receptor adrenérgico común al que denominó “alpha” (α). De igual forma, comprobó que esas mismas aminas poseían un rango totalmente distinto de potencia cuando mediaban otro conjunto de respuestas en el organismo. Ahlquist asumió que esas diferencias en el comportamiento de las aminas eran debidas a que los receptores implicados en estas últimas respuestas eran distintos de los receptores implicados en las primeras respuestas, y a este segundo receptor adrenérgico distinto del receptor α le denominó receptor “beta” (β) (Ahlquist, 1948). Por tanto, fue Ahlquist el primero en establecer una clasificación farmacológica de los receptores adrenérgicos. Los receptores α adrenérgicos mediaban la mayor parte de las funciones excitadoras (vasoconstricción, contracción de la musculatura uterina, contracción del uréter, dilatación pupilar, etc...) y una importante función inhibitoria (la relajación intestinal). Por el contrario, los receptores β adrenérgicos mediaban la mayor parte de las funciones inhibitorias (vasodilatación, relajación de la musculatura uterina, broncodilatación, etc...) y una importante función excitadora (la estimulación cardíaca). El nuevo concepto establecido por Ahlquist de la existencia de dos receptores adrenérgicos distintos se oponía directamente a la hipótesis de la existencia de dos mediadores responsables respectivamente de las funciones excitadoras e inhibitorias. No se encontró por otra parte en el organismo ninguna amina conocida que se ajustara totalmente a los requerimientos de las “Simpatinas” propuestas por Cannon y Rosenblueth. Por el contrario, los resultados de Ahlquist apoyaban fuertemente la teoría de que la Ad constituía el único mediador endógeno del sistema adrenérgico, y esta catecolamina por sí sola mediaba funciones excitadoras o inhibitorias en base al tipo de receptor adrenérgico con el que interaccionaba.

Años después de los estudios de Ahlquist, Lands y colaboradores propusieron una división de los receptores β adrenérgicos, pues no podían explicar con facilidad los resultados que obtenían en sus experimentos si asumían que éstos constituían una población única (Lands et al., 1966). Al establecer las potencias relativas de las aminas simpaticomiméticas para controlar una serie de funciones fisiológicas en el organismo, Lands observó que procesos como la lipólisis y la función cardíaca estaban mediados por el mismo tipo de receptor β adrenérgico, y este receptor recibió la denominación de β_1 . Por el contrario, la glucogenólisis del músculo esquelético y la broncodilatación estaban reguladas por una población diferente de receptores β adrenérgicos que se denominó β_2 . Lands afirmó que existían por lo tanto tres poblaciones de receptores adrenérgicos: α , β_1 y β_2 (Lands, 1967a,b). Después de estas investigaciones, el estudio de los receptores β adrenérgicos desató un interés creciente, coincidiendo ésto además con la incorporación en terapéutica por una parte de los fármacos β -bloqueantes para el tratamiento de la HTA, angina de pecho, ciertas formas de isquemia

miocárdica, arritmias cardíacas, glaucoma y migraña, y por otra de los fármacos estimulantes β adrenérgicos para el tratamiento antiasmático.

La estrecha relación entre la estructura química y la actividad farmacológica que mostraban distintos fármacos había permitido en realidad una fácil clasificación de los receptores β adrenérgicos en dos tipos, los β_1 y los β_2 . Esta clasificación fue aceptada por la mayoría de los investigadores (Furchgott, 1967; Langer, 1974), y permanece vigente en el momento actual. Tras establecer esta clasificación se desarrollaron sin embargo un gran número de fármacos selectivos de los receptores β adrenérgicos (Nuttall y Snow, 1982; Kauman y Lemoine, 1985; Lemoine et al., 1985; Satoh et al., 1993; Strosberg y Pietri-Rouxel, 1996), y como consecuencia se definieron también otros dos tipos de receptores β adrenérgicos atípicos, los β_3 y los β_4 . Estos receptores eran insensibles a los antagonistas β adrenérgicos clásicos (Arch et al., 1984; Bond y Clarke, 1988). El receptor β_3 se expresa predominantemente en tejido adiposo y participa en la regulación que ejerce la NA sobre los cambios del metabolismo energético y la termogénesis. Es unas 10 veces más sensible a la NA y a la isoprenalina que a la Ad, y presenta escasa afinidad por el propranolol. Hoy día se han conseguido agonistas y antagonistas selectivos para este receptor (Manara et al., 1995; Oshita et al., 1997; Savontaus et al., 1998). Se están diseñando actualmente agonistas β_3 para su uso en el tratamiento de la obesidad (Kauman, 1997). El receptor β_4 está localizado prioritariamente en el tejido cardíaco, y aunque no existen ligandos selectivos para este receptor se sabe que muestra poca afinidad por Ad y NA, pero se bloquea con bupranolol (Kauman, 1997).

1.1.2.- Clasificación, distribución y función de los receptores α adrenérgicos

Hemos señalado que en esta Introducción nos vamos a centrar en los receptores α adrenérgicos y de ellos nos ocuparemos a continuación. Su estudio se inició en la década de los setenta, es decir algo después de haber comenzado ya el estudio de los receptores β adrenérgicos. Hay que tener en cuenta que inicialmente no existía una clara relación entre la estructura química y la actividad farmacológica de los agonistas y antagonistas de los receptores α adrenérgicos, y además resultaba difícil entender el papel fisiológico de estos receptores y parecía limitado el interés terapéutico que podían tener los compuestos que actuaban en ellos. Existió al principio por todo ello un cierto rechazo hacia su estudio y valoración en todos los campos, en el de la Farmacología, en el de la Fisiología y en el de la Medicina Clínica. La necesidad de introducir una nomenclatura similar a la de los receptores β adrenérgicos, hizo resurgir a pesar de todo el interés por los receptores α adrenérgicos. Existían además algunos antecedentes que resultaron útiles para su clasificación inicial. Así

por ejemplo, en 1957 Brown y Gillespie habían observado que tras la administración de antagonistas α adrenérgicos, como fenoxibenzamina y dibenamina, se incrementaba la liberación del neurotransmisor desde las terminaciones nerviosas que inervaban el bazo de gato (Brown y Gillespie, 1957). Previamente Bacq y Frederico habían descrito este mismo hallazgo, pero su aportación pasó inadvertida, ya que tampoco se supo interpretar adecuadamente (Bacq y Frederico, 1934). En realidad, inicialmente distintos investigadores explicaron este proceso como un bloqueo de la recaptación del neurotransmisor producido por el antagonista α adrenérgico (Thoenen et al., 1964). Fue Starke en 1971 quien demostró que el aumento en la liberación de NA que ocasionaban los antagonistas α no interfería para nada con la recaptación del neurotransmisor ni con su transportador. Estudiando los mecanismos implicados en los procesos de liberación de la NA desde las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, Starke comprobó además que el aumento de dicha liberación originado por yohimbina y rauwolscina (antagonistas α adrenérgicos), era un fenómeno que requería la unión de estos fármacos a un receptor α adrenérgico localizado a nivel presináptico (Starke et al., 1971a,b). También comprobó que, de forma inversa, determinados agonistas α adrenérgicos (clonidina y xilazina) podían inhibir la liberación neurogénica de NA, y ella misma podía también inhibir su propia liberación por un proceso de retroalimentación negativo, que de igual modo precisaba del estímulo de este receptor α adrenérgico presináptico (Starke, 1972a,b). Los estudios de Langer también fueron importantes para establecer la existencia de estos receptores α presinápticos, que mediaban el control de la liberación de NA (Langer et al., 1971).

Con el diseño de agonistas α adrenérgicos más selectivos, se comprobó más adelante que la demanda farmacológica de los receptores α adrenérgicos localizados a nivel presináptico, y la de los localizados a nivel postsináptico, era distinta. Se aportaron además otras evidencias de que los receptores α adrenérgicos que tenían distintas localizaciones anatómicas constituían entidades farmacológicas distintas y esta idea fue aceptada por la mayoría de los investigadores dedicados al estudio de estos receptores (Dubocovich y Langer, 1974; Starke et al., 1974, 1975; Starke, 1977). Como resultado de sus ensayos *in vitro*, Langer en 1974 propuso además que el receptor α adrenérgico postsináptico que mediaba las respuestas en el órgano efector se llamase receptor α_1 adrenérgico, y que el receptor α adrenérgico presináptico que regulaba la liberación de NA se llamase receptor α_2 adrenérgico (Langer, 1974). Pronto se demostró sin embargo que esta clasificación de los receptores α adrenérgicos basada en el lugar anatómico resultaba inapropiada, pues difícilmente se podrían clasificar como presinápticos los receptores α_2 adrenérgicos encargados de mediar procesos como la inhibición de la glicólisis y la lipólisis (Schimmel, 1976). Además, se comprobó que algunos receptores α adrenérgicos localizados postsinápticamente mostraban afinidad

farmacológica similar a la de los receptores α_2 presinápticos, y se confirmó por ello la presencia de receptores α_2 adrenérgicos en ambas localizaciones anatómicas, presináptica y postsináptica. Por estos motivos, Betherseln y Pettinger sugirieron una clasificación funcional de los receptores α adrenérgicos basada en la función que mediaba cada receptor más que en su localización anatómica (Betherseln y Pettinger, 1977). Se denominaron receptores α_2 adrenérgicos a la población de receptores responsable de las respuestas inhibitorias, y receptores α_1 adrenérgicos a la población responsable de las respuestas excitadoras, independientemente de que se encontraran localizados a nivel pre- o postsináptico. Más tarde sin embargo se vio invalidada de nuevo esta clasificación cuando Drew y Whitting en 1979 plantearon el hecho de que la vasoconstricción originada por NA no sólo se inhibía por antagonistas α_1 adrenérgicos como el prazosin, sino también por antagonistas α_2 adrenérgicos selectivos como la yohimbina, demostrando así que respuestas excitadoras también podían estar mediadas por receptores α_2 adrenérgicos (Drew y Whitting, 1979). Tampoco encajaban además tampoco en la clasificación funcional los receptores que mediaban la agregación plaquetaria cuando se administraban de agonistas α_2 adrenérgicos (Grant y Scrutton, 1979).

Se llegó por tanto a la conclusión de que ni la diferenciación anatómica, ni la diferenciación funcional, constituían formas fiables para clasificar los receptores α adrenérgicos. Con el desarrollo de la industria farmacéutica y el diseño de nuevos fármacos con gran selectividad por las distintas poblaciones de receptores α adrenérgicos, se estableció una diferenciación más acertada de estos receptores basada en sus distintas afinidades farmacológicas. Esta diferenciación de los receptores, era independiente de su localización respecto a la sinapsis nerviosa, y era independiente también del tipo de función que su activación mediara. Así, un receptor α adrenérgico que se activara por metoxamina, cirazolina o fenilefrina, y que se inhibiera de forma competitiva por bajas concentraciones de prazosin, coriantina y el compuesto WB-4101, se denominaría **receptor α_1 adrenérgico**. Sin embargo, aquellos receptores que respondían a la activación con los compuestos B-HT 920, B-HT 933 y UK-14,304, o con α -metilNA, y que se inhibían competitivamente por bajas concentraciones de yohimbina, rauwolscina o idazoxan, se clasificaron como **receptores α_2 adrenérgicos** (Van Zwieten y Timmermans, 1984; Ruffolo y Hieble, 1994).

Después de realizar tantos esfuerzos para conseguir una clasificación acertada de los receptores α adrenérgicos en los dos tipos α_1 y α_2 , pareció necesario estudiar su **distribución** en los distintos órganos y tejidos del organismo. De esta distribución nos ocuparemos a continuación.

Ya hemos señalado que algunos receptores α están localizados a nivel presináptico, y comenzaremos por hacer algunos comentarios sobre estos receptores. El **receptor α adrenérgico presináptico** está localizado a nivel de la membrana de la fibra postganglionar, próximo a las vesículas de almacenamiento del neurotransmisor correspondiente. La activación de este receptor, ya sea por los neurotransmisores endógenos NA o Ad, o por agonistas exógenos como los fármacos α simpaticomiméticos, inhibe la liberación del neurotransmisor correspondiente a través de un mecanismo de retroalimentación negativo. Los receptores α adrenérgicos presinápticos son fundamentalmente del tipo α_2 . La mayoría de los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos se han encontrado en terminaciones nerviosas noradrenérgicas que inervan distintos órganos, como por ejemplo varios tipos de vasos sanguíneos (Starke, 1977; 1981b; Doxey y Roach, 1980; Langer, 1981), el bazo (Langer, 1973), el corazón (Starke, 1972a; Drew, 1976; Lokhandwala et al., 1977; Pichler y Kobinger, 1978) y los conductos deferentes (Doxey et al., 1977; Drew, 1977). Los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos se descubrieron inicialmente en preparaciones aisladas de arteria pulmonar de conejo, y por tanto en este tejido es donde más se estudiaron (Starke, 1977, 1981b). Probablemente sin embargo, los mismos receptores α_2 presinápticos localizados en otros tejidos son muy similares a éstos. También se han identificado receptores α_2 adrenérgicos presinápticos en terminaciones nerviosas colinérgicas (Starke, 1977; Drew, 1978; Wikberg, 1979, Starke, 1981b) y serotoninérgicas (Göthert y Huth, 1980), así como en los somas o cuerpos celulares de neuronas noradrenérgicas (Brown y Caulfield, 1979). Algunos estudios experimentales recientes demuestran también que los receptores α presinápticos son mayoritariamente receptores α_2 (French et al., 1995), y señalan la importancia de estos receptores α_2 presinápticos en las inervaciones simpáticas de la vejiga (Andersson, 1999) y en el hígado (Vom-Dahl et al., 1999). También son importantes los receptores α_2 presinápticos de las terminaciones nerviosas que inervan el intestino, y en especial los de las terminaciones nerviosas que inervan el colon (Luckensmeyer y Keast, 1998).

Una pequeña proporción de los receptores α adrenérgicos presinápticos se corresponden con el tipo α_1 (Kobinger y Pichler, 1980, 1982; Docherty, 1983a,b). Algunos estudios apoyan de hecho la idea de que existe una inhibición presináptica mediada por receptores α_1 en una serie de tejidos como el ventrículo de rata, los vasos deferentes de rata, el riñón de rata, el corazón de perro, la arteria de la cola de la rata, y las terminaciones nerviosas colinérgicas del estómago de rata (Docherty, 1989). Otros estudios han demostrado sin embargo que la administración de agonistas α_1 adrenérgicos facilita la liberación del neurotransmisor desde las terminaciones nerviosas colinérgicas que inervan el corazón de rata (Bognar et al., 1990), la vejiga de la rata (Yoshimura y de Groat, 1992) y la vejiga del gato

(Keast et al., 1990). También facilitan estos agonistas la liberación del neurotransmisor desde las terminaciones nerviosas noradrenérgicas en sinaptosomas corticales de rata (Pastor et al., 1996) y en la vejiga de gato (Somogyi et al., 1995). Para algunos investigadores la liberación de neurotransmisores mediada por receptores α_1 adrenérgicos ocurriría por lo tanto en las mismas terminaciones nerviosas en las que los receptores α_2 adrenérgicos mediaban una inhibición de su liberación (Keast et al., 1990). Parece por consiguiente clara la existencia de receptores α_1 adrenérgicos presinápticos, pero en realidad su papel facilitador o inhibitorio en la modulación de la liberación de neurotransmisores bajo condiciones fisiológicas y patológicas está todavía sin aclarar definitivamente (Ruffolo y Hieble, 1994; Docherty, 1998b).

Nos ocuparemos a continuación de la distribución de los **receptores α adrenérgicos postsinápticos**. Los receptores α adrenérgicos postsinápticos aparecen en distintos tejidos que incluyen distintos músculos lisos. Entre ellos los músculos vascular, bronquial, uterino, conducto deferente, vejiga, próstata y el músculo gastrointestinal. Aparecen también en el endotelio vascular, el corazón, el riñón, el aparato yuxtglomerular, las plaquetas, los hepatocitos, los islotes pancreáticos, los adipocitos, los melanocitos y el ojo. Haremos algunos comentarios a continuación sobre los receptores α adrenérgicos postsinápticos de todos estos tejidos.

Los receptores α adrenérgicos postsinápticos del **músculo liso vascular** se han estudiado mucho. En este tejido se demostró por primera vez la presencia de ambos receptores α adrenérgicos, los α_1 y los α_2 . Además, se comprobó que en este tejido los receptores α_1 y los receptores α_2 se encontraban distribuidos aproximadamente en la misma proporción. Este descubrimiento llevó al entendimiento de que la nomenclatura α_1/α_2 no tenía por qué estar necesariamente asociada con la localización post/presináptica de los receptores (Starke, 1981a; Timmermans y Van Zwieten, 1981, 1982; Langer y Shepperson, 1982; McGrath, 1982). Se comprobó de hecho que tanto el estímulo de los unos, como el estímulo de los otros, originaba vasoconstricción con el consiguiente incremento de la presión arterial (PA) (Reid, 1981). Hoy día algunos datos experimentales también demuestran la necesidad de que coexistan ambos receptores postsinápticos, los α_1 y los α_2 , para mediar la vasoconstricción de determinados vasos como la arteria carótida (Willens et al., 1999).

Para estudiar los receptores α postsinápticos del músculo liso vascular se han utilizado muchas preparaciones, y se han llevado a cabo experiencias *in vivo* e *in vitro*. Los ensayos *in vivo* del grupo de Van Zwieten en la preparación de “pithed rat” (rata descerebrada y desmedulada) fueron entre otros muy útiles. En esta preparación la inervación presináptica del

sistema nervioso autónomo se interrumpe, ya que el animal se descerebra y desmedula. Sólo aparecen por lo tanto respuestas adrenérgicas postsinápticas. Con este modelo pudo demostrarse que la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos con agonistas selectivos, tales como metoxamina, cirazolina y fenilefrina, producía una respuesta presora que se antagonizaba a su vez de forma competitiva con antagonistas selectivos α_1 adrenérgicos como el prazosin y la coriantina. El antagonismo era sin embargo mucho menos marcado con yohimbina o rauwolscina. En esta misma preparación también se veía que los agonistas selectivos α_2 adrenérgicos, tales como los compuestos B-HT 920, B-HT 933 y UK-14,304, también originaban incrementos presores que se antagonizaban a su vez con distintos antagonistas selectivos de los receptores α_2 adrenérgicos, mostrando así mismo los antagonistas selectivos de los receptores α_1 adrenérgicos menor efecto para antagonizar dichas respuestas (Timmermans y Van Zwieten, 1980, 1981, 1982). Otra preparación muy utilizada para estudiar los receptores α adrenérgicos postsinápticos en el músculo liso vascular fue la preparación de los miembros posteriores perfundidos de ratas reserpinizadas. Este modelo, desarrollado por Kobinger y Pichler (Kobinger y Pichler, 1981), también demostró la presencia de ambos tipos de receptores α adrenérgicos en el músculo liso vascular.

La existencia de los receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos vasculares también se demostró fácilmente cuando se llevaban a cabo estudios *in vitro* en preparaciones de venas y arterias. Así mismo, también fue fácil demostrar la presencia de receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos en el músculo liso vascular cuando se trabajaba con preparaciones vasculares venosas. Fueron muy útiles para ello las preparaciones de la vena safena y de la vena femoral de perro, y las respuestas eran especialmente buenas en la vena safena de perro (Sullivan y Drew, 1980; De Mey y Vanhoutte, 1981; Curro y Greenberg, 1983; Fowler et al., 1984; Cooke et al., 1985; Flavahan y Vanhoutte, 1986; Rhodes y Waterfall, 1987). En las preparaciones de arterias aisladas resultó sin embargo más complicado demostrar la presencia de receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos. Por ello se sugirió que en las venas la densidad de los receptores postsinápticos α_2 adrenérgicos podía ser mayor que en las arterias (De Mey y Vanhoutte, 1981; Vanhoutte, 1982; Hieble y Woodward, 1984). Haciendo uso de agonistas α adrenérgicos muy selectivos se pudo demostrar a pesar de todo la presencia de receptores postsinápticos α_2 adrenérgicos en distintas arterias, tales como la arteria basilar de perro (Timmermans et al., 1982), las arterias mesentéricas de perro (Kou et al., 1984; Itoh et al., 1987), la arteria de la cola de rata (Medgett, 1985), y la arteria digital humana (Moulds y Stevens, 1984; Stevens y Moulds, 1985, 1986). Algunos estudios con voluntarios sanos en los que se llevaban a cabo medidas de flujo sanguíneo en el antebrazo con técnicas pletismográficas, demostraron que en

los vasos de resistencia del antebrazo humano existían también receptores α_2 (Van Brumelen et al, 1982; Jie et al., 1984).

Finalmente, se concluyó que los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos podían presentar características distintas en las arterias y en las venas, y que su localización respecto a la sinapsis podía ser también distinta en ambos tipos de vasos. En las arterias el receptor α_1 adrenérgico postsináptico estaba localizado intrasinapsis, en contacto con las terminaciones nerviosas noradrenérgicas que inervaban el vaso, siendo de esta forma rápidamente accesible para el neurotransmisor NA. Su posición anatómica se correspondía con la capa adventicia. El receptor α_2 adrenérgico postsináptico se localizaba más alejado de la zona de la sinapsis (extrasinápticamente), y su localización correspondía a la túnica íntima. Este receptor podía por consiguiente ser más accesible a las catecolaminas circulantes (Langer et al., 1980; Langer y Shepperson 1982; Ariens y Simonis, 1983; Van Zwieten, 1986). Por su localización más accesible para la NA liberada desde el terminal nervioso simpático que inervaba el vaso, el papel fisiológico del receptor α_1 adrenérgico postsináptico en las arterias podía ser el mantenimiento del tono vascular en condiciones basales. Estudios recientes llevados a cabo para averiguar el efecto que causa la edad en la funcionalidad de estos receptores adrenérgicos, han mostrado que las respuestas contráctiles a los agonistas α_1 adrenérgicos pueden estar afectadas por la edad (Tabernero y Vila, 1995). Estos cambios en las respuestas de los receptores se han relacionado sin embargo con una alteración de la función endotelial.

El papel fisiológico del receptor α_2 adrenérgico postsináptico de las arterias no está sin embargo del todo claro. Se ha sugerido que este receptor actuaría más como una diana de las hormonas sanguíneas. Los niveles de estas hormonas son muy bajos usualmente, pero en determinadas situaciones, como cuando hay estrés, estos niveles pueden elevarse lo suficiente como para activar los receptores α_2 (Cutter et al., 1980). En sujetos hipertensos se han encontrado así mismo niveles elevados de catecolaminas (Brown et al., 1981; Bühler et al., 1982). Las concentraciones de catecolaminas plasmáticas también están alteradas en animales con HTA experimental (Winternitz y Oparil, 1982; Oparil et al., 1990; 1991; Ando et al., 1991; Scrogin et al., 1991). Estudios de unión de ligandos marcados radiactivamente al receptor ("binding") llevados a cabo tanto en sujetos hipertensos como en animales con HTA experimental también han demostrado una alteración en la densidad y/o funcionalidad de los receptores α_2 adrenérgicos (Philipp et al., 1978; Mattiason et al., 1979; Morris et al., 1981; Brodde et al., 1983; Sánchez et al., 1986; Takata y Kato, 1996; Gesek, 1999). Estos receptores estarían por tanto implicados en la contracción vascular en estados patológicos importantes, tales como la HTA y posiblemente el fallo cardíaco congestivo, donde las catecolaminas tienen niveles más altos. Estudios recientes reflejan además que la modificación de los receptores α_2

adrenérgicos en procesos como la HTA está relacionada con una alteración de las proteínas G a las que están acoplados (Masutani et al., 1999; Varani et al., 1999). Las respuestas presoras de los agonistas α_2 adrenérgicos también se reducen con la edad, y ésto probablemente se debe a que también disminuye la sensibilidad de los receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos (Docherty et al., 1988). Las catecolaminas plasmáticas pueden también alterarse con la edad, ya que entonces existe una recaptación menor de la NA, y posiblemente también una liberación mayor del neurotransmisor desde los terminales nerviosos (Docherty et al., 1990a). Esto último podría relacionarse con una disminución en la sensibilidad de los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos.

En las venas probablemente sucedía lo contrario de lo que ocurría en las arterias. Distintos estudios indicaron que en las venas el receptor mayormente innervado era el α_2 , y el α_1 se localizaba más alejado de la sinapsis (Flavahan y Vanhoutte, 1986; Ruffolo, 1986; Segstro y Greenway, 1986; Flavahan et al., 1987). Por todo ello se aceptó que las respuestas mediadas por los receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos en la circulación venosa eran más marcadas que las respuestas mediadas por estos receptores en la circulación arterial (Ruffolo, 1986). Parece que la capacidad de las venas para responder a la estimulación simpática también disminuye con la edad; ensayos con venas safenas humanas obtenidas durante la cirugía de varicosidades venosas así lo demuestran (Docherty, 1993).

Hay que señalar además que los estudios del grupo de Ruffolo indicaron que en la aorta de rata existía un receptor α adrenérgico difícil de definir farmacológicamente (Ruffolo et al., 1980, 1981, 1982). Este receptor inicialmente se comprobó que tenía una gran afinidad por la clonidina y la yohimbina, y ésto indicaba que se trataba de un receptor α_2 adrenérgico. Este dato se alejaba bastante de los existentes hasta ese momento al estudiar la población de receptores α adrenérgicos en la aorta de otras especies animales. Así por ejemplo, en la aorta de conejo la población adrenérgica mayoritaria era la α_1 (Docherty et al., 1981). Parecía que la rata era el único mamífero en el que se hallaban en mayor número los receptores α adrenérgicos con elevada afinidad por los agonistas y antagonistas selectivos α_2 adrenérgicos. Posiblemente ésto era también debido a que la rata era la única especie en la que se había descrito una pérdida de la innervación adrenérgica (Patil et al., 1972). Había quedado establecido que en las arterias los receptores α adrenérgicos localizados intrasinápticamente eran del tipo α_1 , y los localizados más distantes de las terminaciones nerviosas eran sin embargo α_2 . Se podía pensar que quizá la falta de innervación en la aorta de rata pudiera hacer parecer a sus receptores α adrenérgicos más del tipo extrasinapsis en lo que a sus afinidades farmacológicas se refería. Sin embargo, el problema surgió cuando se comprobó que este

receptor α adrenérgico también respondía a la estimulación con agonistas selectivos α_1 , tales como fenilefrina y metoxamina. Se llegó entonces al acuerdo de que el receptor α adrenérgico de la aorta de rata poseía propiedades comunes a ambos tipos de receptores α adrenérgicos, los α_1 y los α_2 , y no debía forzarse su clasificación como uno u otro tipo de receptor, pudiendo admitirse sin embargo la existencia de un tercer tipo de receptor α adrenérgico postsináptico. En realidad, únicamente se consiguió identificar el receptor α adrenérgico presente en la aorta de la rata años más tarde cuando se describieron los distintos subtipos de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos.

El estímulo de los receptores α adrenérgicos en el músculo liso vascular se ha utilizado en terapéutica para producir una acción vasoconstrictora local, y existen fármacos que se utilizan como descongestionantes de mucosas, principalmente la respiratoria y la conjuntiva. La vasoconstricción local por estímulo de los receptores α adrenérgicos puede resultar también útil para evitar hemorragias locales y para retrasar la absorción de los anestésicos locales cuando éstos se administran. También se ha utilizado en terapéutica el bloqueo de los receptores α_1 adrenérgicos del músculo liso vascular para producir una disminución de la PA cuando ésta está elevada. La utilización de bloqueantes α_1 en la HTA tiene el inconveniente de que estos fármacos ocasionan fácilmente hipotensión ortostática, y producen además otros efectos no deseados como resultado del bloqueo de los receptores α_1 adrenérgicos de otros tejidos. Por este motivo actualmente se utilizan más otros compuestos para el tratamiento de la HTA.

En el **músculo liso bronquial** la población mayoritaria de receptores α adrenérgicos está constituida por receptores α_1 . Su activación origina una contracción de la fibra lisa (Meana y García-Sevilla, 1997; Poulat y Couture, 1998).

En el aparato genitourinario existen también receptores α_1 y α_2 adrenérgicos. El **conducto deferente** (Meana y García-Sevilla, 1997; Burt et al., 1998; Docherty, 1998a) y la **vejiga** (Caine et al., 1975; Tsujimoto et al., 1986; Lepor et al., 1993; Meana y García-Sevilla, 1997) tienen receptores de ambos tipos. La implicación de los receptores α_2 adrenérgicos en la contracción de estos tejidos es muy pequeña, por lo que se desconoce cuál es exactamente su papel. En la vejiga los receptores α_1 se localizan principalmente en la base y controlan la contracción del esfínter y el trígono. Existe hoy día un interés creciente por encontrar ligandos específicos para estos receptores que podrían resultar útiles en el tratamiento de patologías relacionadas con la vejiga (Andersson, 1999). En la contracción de la **uretra** participan en igual proporción los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos, aunque en la uretra proximal es más abundante

la población α_1 adrenérgica (Lepor y Shapiro, 1984, Lepor et al., 1993). Parece que en la uretra de las mujeres predomina la población de receptores α_2 adrenérgicos, lo cual se ha asociado con una regulación a la alta por parte de los estrógenos (Yablonsky et al., 1986; Taniguchi et al., 1997). En la **próstata** predominan los receptores α_1 (Hieble et al., 1985; Shapiro et al., 1987; Muramatsu et al., 1994; Marshall et al., 1995; Meana y García-Sevilla, 1997). La “hipertrofia benigna prostática” es una patología que cursa con una obstrucción de la uretra de dos componentes: un componente estático consecuencia de una hiperplasia de la próstata y un componente dinámico debido a la contracción del músculo liso del cuello de la vejiga, próstata y uretra, mediada por receptores α_1 adrenérgicos. Por todo ello, hace ya tiempo se pensó en el uso de antagonistas α_1 adrenérgicos para el tratamiento de esta patología y existe una experiencia clínica considerable al respecto (Caine et al., 1976, Caine, 1986, 1990; Cockett et al., 1993). El objetivo ha sido conseguir agentes uroselectivos mas eficaces y con menor incidencia de efectos secundarios por el bloqueo de receptores α_1 en otras regiones del organismo. El alfuzosin fue el primer antagonista α_1 adrenérgico uroselectivo que apareció (Lefevre-Borg et al., 1993). Actualmente se están estudiando nuevos y mas selectivos agentes para el tratamiento esta patología de elevada incidencia en la población anciana masculina (Andersson, 1996; Chess-Williams et al., 1996; Kirby y Jardin, 1997; McGrath et al., 1999)

En el **útero** el estímulo de ambos receptores, los α_1 y los α_2 , causa la contracción de la musculatura (Hoffman et al., 1981; Rosen et al, 1984; Meana y García-Sevilla, 1997). Los receptores α_1 adrenérgicos se encuentran en igual proporción en las células musculares longitudinales y circulares, mientras que los receptores α_2 adrenérgicos son mayoritarios en las células musculares longitudinales y su regulación está afectada por el ciclo de los estrógenos (Taneike et al., 1999).

En el caso de la musculatura **gastrointestinal** el estímulo de ambos receptores, los α_1 y los α_2 , tiene efectos opuestos, de forma que la activación α_1 adrenérgica origina un aumento en la motilidad intestinal y por el contrario la activación α_2 adrenérgica produce relajación de la musculatura gastrointestinal. Existe en realidad una acción inhibitoria de la liberación de NA mediada a través de receptores α_2 adrenérgicos presinápticos localizados en las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Cheng et al., 1981; Meana y García-Sevilla, 1997). Así mismo, existen también receptores α_2 presinápticos en las terminaciones colinérgicas que median una inhibición de la contracción del intestino delgado (Wikberg, 1977).

Se demostró también la existencia de receptores α adrenérgicos en el **endotelio** de la mayor parte de las preparaciones vasculares estudiadas, y se comprobó que su activación

mediaba la liberación del llamado factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Cock y Angus, 1983). Parece sin embargo, que la magnitud de esta respuesta vasodilatadora de los agonistas α adrenérgicos dependiente de endotelio, es variable y está condicionada en gran medida por el calibre del vaso y por la especie animal utilizada (Angus et al., 1986). En 1989 Vanhoutte y Miller comprobaron que los receptores endoteliales adrenérgicos implicados en la liberación del EDRF pertenecían al subtipo α_2 , y señalaron que la estimulación de estos receptores podía justificar el efecto vasodilatador de las catecolaminas en algunos lechos vasculares (Vanhoutte y Miller, 1989). Más recientemente se ha demostrado que en el endotelio existen receptores α_1 , y su estímulo también facilita la relajación vascular endotelio dependiente (Panza et al., 1995). Las células endoteliales liberan por tanto EDRF, y lo hacen tanto por activación de receptores α_1 como por activación de receptores α_2 (Kaneko et al., 1993; Hu et al. 1994; Segawa et al., 1998). Se ha podido comprobar que en las arterias bronquiales de conejo la activación α_1 adrenérgica induce la liberación de óxido nítrico (NO), y la activación α_2 adrenérgica induce la liberación de un prostanoide relajante del músculo liso (Zschauer et al., 1997). Por tanto, la activación α adrenérgica en el endotelio origina la liberación de distintos mediadores vasodilatadores del músculo liso vascular, y la liberación de cada uno de estos mediadores probablemente es dependiente del lecho vascular y la especie animal.

Pese a que el principal receptor adrenérgico implicado en el control de la función cardíaca es el β_1 , hace años se propuso que también existían receptores α adrenérgicos en el **miocardio** (Govier et al., 1967, 1968). Durante mucho tiempo se debatió el tipo de receptor α adrenérgico presente en los miocitos cardíacos. La mayoría de los estudios funcionales y de "binding", indicaron que se trataba del receptor α_1 adrenérgico (Karlner et al., 1979; Corr et al., 1981). Se han encontrado sin embargo algunas diferencias entre estos receptores, y los receptores α_1 adrenérgicos presentes en otros órganos (Wagner et al., 1980). Su papel fisiológico también se ha discutido mucho, y parece que los receptores α_1 adrenérgicos del corazón podrían mediar una respuesta ionotrópica positiva selectiva, es decir un aumento de la contracción, con poco o ningún cambio en la frecuencia cardíaca. Además, esta respuesta ionotrópica positiva es menos intensa, aunque de mayor duración en el tiempo, que la respuesta mediada por estímulo de los receptores β_1 . A diferencia también de la respuesta ionotrópica β_1 típica, la respuesta ionotrópica mediada por receptores α_1 es más aparente a bajas frecuencias cardíacas (Benfey et al., 1982). Algunos investigadores han estudiado la densidad de receptores α_1 adrenérgicos en tejido cardíaco en ratas hipertensas, y han observado que su densidad aumenta en estos animales (Hanna y Khairallah, 1986; Limas y Limas, 1987). Otros investigadores han demostrado que existen receptores α_2 adrenérgicos en el corazón de rata (Daswood y Spyer, 1986; Wilson, 1991), y al estudiar la distribución del

receptor α_2 en este tejido, vieron que su densidad disminuía cuando las ratas eran hipertensas (Wilson, 1991). Hoy día se sabe que en las neuronas cardíacas intrínsecas que inervan el corazón existen ambos tipos de receptores α adrenérgicos, los α_1 y los α_2 , y se sabe también que ambos intervienen en la regulación de la función cardíaca (Armour, 1997). Datos experimentales recientes indican sin embargo, que las respuestas ionotrópicas positivas que ocasionan los agonistas α en la preparación de "pithed rat", están mediados por receptores α_1 adrenérgicos (Broadley et al., 1999). Un estudio actual, utilizando técnicas de "binding", ha intentado mapear toda la población de receptores α_1 adrenérgica en el miocardio para clarificar sus alteraciones en determinadas patologías (Law et al., 2000). Sin embargo, el papel fisiológico de los receptores α adrenérgicos postsinápticos en el corazón no está todavía totalmente claro.

Los resultados iniciales de los ensayos farmacológicos que evaluaban la agregación plaquetaria con agonistas α parecían indicar que en las **plaquetas** existían receptores α_2 , pero estos resultados presentaron algunas discrepancias, ya que un gran número de agonistas α_2 adrenérgicos selectivos no la originaban. Los ensayos de "binding" mostraban sin embargo claramente la presencia de receptores α_2 adrenérgicos en las plaquetas, y se pudo por tanto llegar a la conclusión de que en realidad los receptores adrenérgicos en ellas localizados eran exclusivamente receptores α_2 adrenérgicos (Grant y Scrutton, 1979; Hoffmann et al., 1979; Shattil et al., 1981; Meana y García-Sevilla, 1997).

En la vasculatura **renal** están presentes ambos tipos de receptores α adrenérgicos, pero inicialmente se señaló, que el que se encargaba de controlar en mayor grado el flujo sanguíneo renal, era el receptor α_1 (Oswald y Greven, 1981). La densidad de receptores α_2 adrenérgicos en el riñón, es sin embargo mayor que la densidad de receptores α_1 adrenérgicos en este órgano. Gracias a las técnicas de autoradiografía se ha visto que los receptores α_1 adrenérgicos se localizan predominantemente en los túbulos corticales y en las arteriolas renales (Muntz et al., 1985; Takatori et al., 1991; Wilson, 1991). Los receptores α_2 adrenérgicos se localizan sin embargo, en los túbulos de la corteza y de la medula prioritariamente (Muntz et al., 1986; Takatori et al., 1991; Wilson, 1991). El estímulo de los receptores α_1 adrenérgicos renales ocasiona vasoconstricción renal (Schmitz et al., 1981) y retención de agua y sodio (Smyth et al., 1985, 1986), y el estímulo de los receptores α_2 adrenérgicos renales puede ocasionar sin embargo una inhibición en la liberación de renina (Pettinger et al., 1976), y puede facilitar (Miller, 1980), o inhibir (Gesek y Strandhoy, 1990), la excreción de sodio y agua. En estudios recientes se señala también que tras la estimulación nerviosa renal se origina un efecto antinatriurético mediado por las poblaciones presinápticas de ambos receptores α

adrenérgicos (Hayashi et al., 1999). En algunos trabajos en los que se utilizan técnicas de autoradiografía, se ha observado que la densidad de ambos receptores α adrenérgicos en el riñón, es mayor en ratas hipertensas que en ratas normotensas (Takatori et al., 1991). Del mismo modo, estudios funcionales han mostrado que la NA activa en mayor grado la reabsorción tubular en ratas hipertensas que en ratas normotensas (Steele y Underwood, 1978). La vasoconstricción renal medida por receptores α_1 adrenérgicos también es mayor en ratas hipertensas (Kobrin et al., 1985; Uchino et al., 1991). El aumento de la respuesta adrenérgica en el riñón de las ratas hipertensas podría relacionarse en parte con un incremento en la densidad de los receptores α_1 adrenérgicos (Sánchez et al., 1990; Michel et al., 1993). También muchos estudios indican que la densidad de receptores α_2 adrenérgicos en el riñón de las ratas hipertensas es mayor (Sánchez et al., 1986, 1989; Michel et al., 1993; Gong et al., 1994). Todo ello parece indicar que los receptores α adrenérgicos del riñón juegan un papel importante en el desarrollo de la HTA experimental. Hay que tener en cuenta, que este incremento en la densidad de los receptores α que presentan las ratas hipertensas, no parece que sea en realidad una consecuencia de que existan niveles de PA elevados. Se ha comprobado de hecho, que el aumento en la población de estos receptores adrenérgicos ocurre ya desde antes que se establezca la HTA (Fukuda et al., 1983; Sánchez et al., 1986). Además, se ha comprobado que esto no ocurre en modelos de HTA experimental de origen no genético (Yamada et al., 1980; Fukuda et al., 1983).

En el **aparato yuxtaglomerular** también existen receptores α adrenérgicos. Estos receptores son sin embargo exclusivamente del tipo α_2 , y se encargan de inhibir la secreción de renina (Meana y García-Sevilla, 1997).

En el **hígado** existen receptores α adrenérgicos, y la población mayoritaria en este órgano está constituida por receptores α_1 . La activación de estos receptores en los hepatocitos facilita la glucogenólisis y la consiguiente hiperglucemia (Meana y García-Sevilla, 1997; Vom-Dahl et al., 1999).

En el **páncreas** también existen receptores α adrenérgicos. Ensayos biológicos llevados a cabo con ratones indicaron que la liberación de insulina procedente de las células β se inhibía por estímulo de receptores α adrenérgicos. Se pudo observar además que la hiperglucemia tras la administración de Ad y NA se inhibía por yohimbina, y por ello se concluyó que la población de receptores α adrenérgicos en los islotes pancreáticos era principalmente α_2 (Smith y Porte, 1976; Nakadate et al., 1980; Meana y García-Sevilla, 1997).

Se ha sugerido también que los receptores α adrenérgicos, y en concreto los receptores α_2 adrenérgicos, están implicados en los procesos de lipólisis. Ensayos biológicos llevados a cabo en **adipocitos** procedentes de hámster y en adipocitos humanos, demostraron que el efecto lipolítico de la teofilina se inhibía tras la administración de clonidina y Ad. Con estos compuestos la inhibición era más efectiva que con la administración de fenilefrina y metoxamina (Schimmel, 1976; Aktories et al., 1980; Lafontan y Berlan, 1980, 1981). Existe por ello la teoría de que los antagonistas α_2 adrenérgicos favorecerían la lipólisis, y de ahí la posible utilización y diseño de fármacos bloqueantes de estos receptores para el tratamiento de la obesidad (Galizky et al., 1988; Meana y García-Sevilla, 1997).

Después de distintos ensayos farmacológicos se llegó además a la conclusión de que la estimulación de los receptores α_2 adrenérgicos era el proceso principalmente implicado en la inhibición de la síntesis de la hormona estimulante de los **melanocitos**. La hormona se sintetiza en estas células y es la responsable de inducir la dispersión de los gránulos de melanina, que a su vez origina la aparición de manchas y el oscurecimiento de la piel (Berthelsen y Pettinger, 1977; Pettinger, 1977; Carter y Schuster, 1982).

La distribución de los receptores adrenérgicos en el **ojo** siempre ha suscitado mucha controversia. Los ensayos llevados a cabo en conejos conscientes demostraron que la administración tópica de agonistas específicos α_2 adrenérgicos producía una respuesta de disminución de la presión intraocular sin modificar el tamaño de la pupila (Innemeet et al., 1981). No quedó muy claro qué población de receptores, los presinápticos o los postsinápticos, mediaba esta respuesta, pero se pensó que dicha respuesta en cualquier caso podía ser interesante para el tratamiento del glaucoma. Hoy día se usan algunos agonistas α_2 adrenérgicos selectivos como la brimodina en pacientes con hipertensión ocular y glaucoma por su capacidad para disminuir la producción de humor acuoso y facilitar su drenaje (Green Field et al., 1997). Las arteriolas que irrigan el iris poseen ambas poblaciones de receptores α adrenérgicos, y la activación de ambos, los α_1 y los α_2 , ocasiona una vasoconstricción que reduce la formación de humor acuoso siendo ésto también interesante para el tratamiento del glaucoma (Sandow y Hill, 1999). Cuando los agonistas α_1 adrenérgicos se administraban en los animales se producía sin embargo una midriasis que iba acompañada de un ligero aumento de la presión intraocular. Esto se debe a que los únicos receptores α del músculo dilatador (células musculares radiales) del iris son los α_1 , y su estímulo origina la contracción de este tejido con la consiguiente midriasis (Sugiyama et al., 1990). El uso de agonistas α_1 adrenérgicos selectivos (fenilefrina especialmente) como midriáticos para facilitar la exploración de la retina tiene a pesar de todo la ventaja frente a otros fármacos como son los

antimuscarínicos de ocasionar muy poco aumento en la presión intraocular (Meana y García-Sevilla, 1997).

La **tabla 11** (página 21), refleja la distribución de los receptores α adrenérgicos postsinápticos y su función en todos los tejidos anteriormente mencionados.

TABLA 11: Distribución de receptores α adrenérgicos postsinápticos en distintos tejidos y respuesta producida por activación.

Tejido	α_1	α_2
MUSCULO LISO		
arterial	contracción	contracción
venoso	contracción	contracción
bronquial	contracción	
vejiga	contracción	
conducto deferente	contracción	
uretra	contracción	contracción
próstata	contracción	
útero	contracción	contracción
gastrointestinal	contracción	relajación
dilatador del iris	contracción	
ENDOTELIO	liberación EDRF	liberación EDRF
MIOCARDIO	inotrópica +	
PLAQUETAS		agregación
RIÑÓN		natriuresis
APARATO YUXTAGLOMERULAR		↓ secreción renina
HEPATOCITOS	glucogenólisis	
CELULAS β PANCREAS		↓ secreción insulina
ADIPOCITOS		↓ lipólisis
MELANOCITOS		↓ síntesis MSH

OJO

↓ producción HA

MSH: hormona estimulante de los melanocitos, HA: humor acuoso, EDRF: factor relajante derivado del endotelio.

Existen además receptores α adrenérgicos en el **sistema nervioso central (SNC)** que están implicados en la regulación de la PA. Hace tiempo se propuso que la estimulación de los receptores α adrenérgicos podía causar un descenso de la PA (Heller, 1933; McCubbin et al., 1960). Schmitt en 1971 fue el primero sin embargo en proponer claramente el papel funcional de los receptores α adrenérgicos centrales para explicar el efecto hipotensor de la clonidina (Schmitt, 1971). La clonidina es una imidazolina que se diseñó originalmente como vasoconstrictor y descongestionante de las mucosas y sus propiedades sedantes e hipotensoras se descubrieron por casualidad. La teoría de Schmitt se basó en los siguientes hallazgos experimentales. En primer lugar, la clonidina era claramente un agonista de receptores α adrenérgicos, puesto que tenía una estructura muy semejante a la de la nafazolina, que era a su vez el representante del grupo de agonistas imidazolínicos de los receptores α periféricos. Además, la clonidina era suficientemente liposoluble como para atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre receptores centrales, y su efecto hipotensor central se antagonizaba por la yohimbina y el piperoxan, que eran a su vez antagonistas α adrenérgicos suficientemente lipofílicos también como para atravesar la barrera hematoencefálica. Por otra parte, se demostró posteriormente que un gran número de derivados imidazolínicos además de la clonidina, y también otros agonistas α adrenérgicos tales como guanfacina, lofexidina y α -metil-dihidroxiifenilalanina, presentaban un mecanismo similar al de este fármaco. Además se comprobó que otros agonistas α adrenérgicos de estructura química muy distinta, como los compuestos B-HT 920 y B-HT 933, actuaban también sobre los receptores α adrenérgicos del SNC (Van Zwieten y Timmermans, 1980; Pichler y Kobinger, 1981a). Por todo ello se llegó a la conclusión de que el estímulo de los receptores α adrenérgicos del SNC promovía un descenso de la PA.

Al principio no se sabía con certeza cuál de las dos poblaciones de receptores α adrenérgicos se encargaba principalmente del control de la PA a nivel central, pero se aceptaba que los fármacos hipotensores de acción central actuaban en el tronco cerebral y no en centros superiores. Schmitt (Schmitt, 1971) y Chalmers (Chalmers, 1975) propusieron como lugares de acción de la clonidina el núcleo del tracto solitario, el centro vasomotor y los núcleos del nervio vago, así como las interconexiones entre ellos. También parecía existir un sitio de acción para la clonidina en el hipotálamo, pero al observarse que eran necesarias dosis elevadas de este fármaco para sus efectos allí, no quedó establecida con certeza la existencia

de receptores α adrenérgicos en esta zona (Struyker Boudie, 1975). Algunos estudios posteriores demostraron que los antagonistas α_1 específicos como la coriantina tenían menor capacidad para inhibir los efectos de la clonidina que los antagonistas α_2 específicos tales como la yohimbina y la rauwolscina (Timmermans et al., 1981a). Por ello se llegó finalmente a la conclusión de que serían fundamentalmente los receptores α_2 adrenérgicos los implicados en el control central del tono arterial. Estos receptores α_2 adrenérgicos centrales se localizan en realidad principalmente en el tallo encefálico, en zonas visceroreceptivas y visceromotoras, pero también en estructuras límbicas posteriores, inervadas por terminaciones ascendentes y descendentes que pueden ser adrenérgicas o noradrenérgicas (Ruffolo y Hieble, 1994). Hoy día se sabe que para la acción de los agonistas α_2 son importantes los receptores localizados en neuronas excitadoras bulboespinales, a través de las cuales el centro ventrolateral rostral de la medula controla el tono simpático (Hayar y Guyenet, 1999).

Surgió también la necesidad de ubicar los receptores α_2 adrenérgicos centrales implicados en el control del tono arterial respecto a la sinapsis nerviosa. Esto resultó más tedioso de lo esperado ya que el SNC es una estructura mucho más compleja que los órganos periféricos. Se había aceptado ya en realidad que existían receptores α_2 adrenérgicos presinápticos en el cerebro, y que su estímulo, a través de un mecanismo de retroalimentación negativo, provocaba la inhibición de la liberación de NA desde las terminaciones noradrenérgicas (Starke, 1977; Langer, 1981; Timmermans y Van Zwieten, 1982). Se podía encontrar por tanto una explicación aceptable asumiendo que la clonidina actuaba a nivel presináptico y disminuía la liberación de NA desde los terminales nerviosos, deprimiendo así la actividad de una neurona facilitadora de la actividad simpática. Se intentó sin embargo explicar también el efecto de la clonidina proponiendo un mecanismo de acción a nivel postsináptico. Se propuso que la activación de receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos aumentaría la actividad de neuronas inhibitorias bulboespinales, originando de igual forma un efecto depresor del simpático. Así, finalmente de un modo u otro, se provocaría un descenso en el tono periférico simpático, y en consecuencia una caída en los niveles de PA. No parecía del todo claro sin embargo cual era la población mayoritaria de receptores α_2 adrenérgicos implicados en el control central de la PA, la presináptica o la postsináptica. Desde el punto de vista farmacológico parece difícil aceptar el hecho de que un agonista α_2 adrenérgico disminuya la PA por un mecanismo de acción postsináptico. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo con 6-hidroxi-dopamina o reserpina para abolir el efecto hipotensor de la clonidina, indicaron que eran fundamentalmente los receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos, y no los presinápticos, los que mediaban la caída de la PA que ocasionaba este fármaco (Kobinger, 1978; Häusler, 1982; Timmermans y Van Zwieten, 1982; Heal et al., 1995). Se llegó a la conclusión de que los

receptores α_2 adrenérgicos presinápticos podían sin embargo estar implicados en otros efectos centrales de la clonidina (Kubo et al., 1986).

Recientemente se ha podido comprobar que los receptores imidazolínicos están también implicados en el control central de la PA, pero el efecto en estos receptores imidazolínicos requiere de la presencia o facilitación de los receptores α_2 adrenérgicos centrales (Bousquet et al., 1999). Se ha asumido que estos receptores imidazolínicos están localizados principalmente en la región del núcleo reticular lateral, y se ha aislado un ligando endógeno para ellos que se ha podido purificar parcialmente del tejido cerebral. Se piensa que este ligando no es una catecolamina, y se ha llamado “sustancia desplazante de clonidina” o “endolacina”. La Rilmenidina es un análogo de clonidina con selectividad relativa para los receptores imidazolínicos centrales, y se ha propuesto que su efecto hipotensor está más relacionado con su acción en receptores imidazolínicos que con su acción en receptores α_2 adrenérgicos centrales. Posee como ventaja frente a los fármacos antihipertensivos α_2 adrenérgicos la escasa o nula sedación que origina, y ello se debe a que este efecto colateral está mediado a través de receptores corticales (Van Zwieten, 1992). Lo mismo sucede con la monoxidina, un nuevo agente de acción central que muestra selectividad agonista para los receptores de imidazolina I1 (Schachter et al., 1998). Algunos investigadores señalan también recientemente que el efecto hipotensor central del compuesto B-HT 920 cuando se administra intracerebroventricularmente está mediado por ambos receptores, los receptores α_2 adrenérgicos y los receptores imidazolínicos (Ricci y Taira, 1999). Se pensó también hace tiempo que el efecto antihipertensivo central de la clonidina y de otros agonistas α_2 adrenérgicos, podía conllevar una interacción entre receptores α_2 adrenérgicos y receptores opioides. Esta teoría se basó en la observación de que los antagonistas opioides como la naloxona atenuaban los efectos cardiovasculares de la clonidina en el hombre y en los animales de experimentación (Kunos et al., 1990).

La activación de los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos periféricos no parece que contribuya en gran medida al efecto hipotensor de los fármacos que como clonidina ocasionan principalmente hipotensión por acción central. En algunos ensayos *in vivo* con gatos se demostró sin embargo que la clonidina tenía una acción inhibitoria periférica (Walland et al., 1978). Esta acción inhibitoria periférica puede contribuir al efecto hipotensor de la clonidina bajo determinadas situaciones en las que la PA escapa del control homeostático mediado por baroreceptores. También algunos investigadores obtuvieron resultados clínicos que avalaban esta idea (Gunnar y Frish-Holmberg, 1981).

Ya hemos mencionado que los receptores α adrenérgicos centrales están también implicados en otros efectos distintos del control del tono arterial. La utilización de los agonistas α_2 adrenérgicos en la HTA puede verse limitada por este motivo. La administración de los fármacos antihipertensivos de acción central siempre lleva asociada la aparición de **bradicardia**. Esto puede explicarse fácilmente porque además de la disminución de la transmisión simpática, parece que la estimulación de los receptores α_2 adrenérgicos centrales también ocasiona un aumento del tono vagal (Kobinger, 1978). Los receptores implicados en este efecto podrían ser los receptores α_2 adrenérgicos del núcleo dorsal del vago (Dashwood et al., 1985). A nivel periférico estos fármacos agonistas α_2 activan así mismo los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos del miocardio, ocasionando ésto también una disminución de la frecuencia cardíaca (De Jonge et al., 1981, 1982). Estudios posteriores señalaron que los receptores α_1 adrenérgicos podían contribuir también a la bradicardia de origen central (Cullen y Reynoldson, 1990).

La **sedación** y la **sequedad de boca** constituyen otros dos de los efectos colaterales clásicos asociados a los fármacos antihipertensivos de acción central. La sedación se produce también por activación de receptores α_2 , y se vio que desaparecía con la administración de yohimbina (Schmitt, 1971). La localización de estos receptores es sin embargo distinta de la localización de los receptores α adrenérgicos implicados en el control del tono arterial. El fenómeno de sedación podría explicarse en realidad aceptando dos procesos. Los antihipertensivos de acción central podrían producir un bloqueo en la información que llega a las zonas sensoriales del tálamo y corteza cerebral, a través de una inhibición de las neuronas noradrenérgicas del *locus cereleus*. Otra posibilidad sería que ocasionasen una inhibición directa de los receptores α_2 adrenérgicos localizados en esas zonas sensoriales corticales, ya que a ellas también podrían llegar estos fármacos (Van Zwieten y Timmermans, 1984). Hay que tener en cuenta que es muy difícil conseguir agentes que una vez que han penetrado en el SNC, accedan selectivamente a las distintas poblaciones de receptores. Ensayos experimentales con agonistas y antagonistas α_2 adrenérgicos demostraron que el efecto de sedación estaba mediado por receptores α_2 adrenérgicos presinápticos (Schmitt, 1971). Después de provocar una deplección de los depósitos de catecolaminas, o tras destruir las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, la clonidina causaba excitación más que sedación en los animales, y otros agonistas α_2 adrenérgicos más selectivos como el compuesto B-HT 920, no ejercían ningún efecto (Pichler y Kobinger, 1981b). Las propiedades sedantes de los agonistas α_2 adrenérgicos, mediadas por autoreceptores somatodendríticos en el *locus coeruleus* se han aprovechado para el diseño de fármacos, tales como medetomidina y xilazina, que resultan útiles en veterinaria como sedantes y anestésicos (Meana y García-

Sevilla, 1997). Por otra parte cabe señalar que, la clonidina se está usando actualmente como coadyuvante en la anestesia epidural. Hay que tener en cuenta que además de actuar en receptores α_2 adrenérgicos presinápticos centrales, la clonidina puede actuar en receptores opioides de la zona, y produce además vasoconstricción en la vasculatura, prolongando así la semivida del anestésico utilizado (Racle, 1990). En lo que respecta a la sequedad de boca, los antihipertensivos de acción central producen una reducción en la secreción de saliva, que se relacionó a su vez con una inhibición de la transmisión colinérgica mediada por receptores α_2 adrenérgicos presinápticos (Green et al., 1979).

Uno de los efectos colaterales típicos de los antihipertensivos de acción central es además la llamada “**hipertensión rebote**”. Este fenómeno se caracteriza por aparición de taquicardia y elevaciones exageradas en los niveles de PA, que se producen cuando el tratamiento se retira bruscamente y no de manera progresiva (Hansson et al., 1973; Reid et al., 1977; Weber, 1980; Hansson, 1983). Estudios en animales han demostrado que este síndrome también se produce si se administra un antagonista α_2 adrenérgico como la yohimbina (Thoolen et al., 1983). Esta hipertensión se ha visto que desaparece con la administración de morfina (Thoolen et al., 1983). Ello es debido a que posiblemente el síndrome está originado por una hiperactividad de las neuronas del *locus cereleus* (Enberg et al., 1982), mecanismo que también está implicado en el síndrome de abstinencia típico de los opioides (Hansson et al., 1973). El hecho de que los agonistas α_2 y los fármacos agonistas de receptores opioides controlen la liberación de NA actuando en las mismas neuronas, es a su vez la base de la utilización de clonidina y compuestos afines en el tratamiento de la deshabituación a opiáceos. Distintos ensayos experimentales (Fielding et al. 1978; Shearman et al., 1980) y clínicos (Washton et al., 1982a,b) así lo demuestran. Por otra parte, también se sabe que existen receptores α_2 adrenérgicos en el cordón espinal cuya activación origina **analgesia**, y se ha visto que la clonidina y otros agonistas α_2 adrenérgicos producen analgesia que no desaparece con la administración de naloxona, pero sí con la administración de yohimbina (Paalzow y Paalzow, 1976; Hynes et al., 1983). También existen algunas aportaciones experimentales que indican que los receptores α_2 adrenérgicos puedan participar en la analgesia fisiológica originada por estrés (Chance, 1983). Estudios experimentales recientes demuestran que el efecto analgésico de mesaconitina está mediado por receptores α adrenérgicos (Ameri, 1998). Recientemente se ha señalado que el efecto analgésico de los agonistas α puede estar mediado por un sistema que implica tanto a los receptores opioides como a los receptores α adrenérgicos centrales (Yu et al., 1998).

También se sabe que los receptores α_2 adrenérgicos tienen un papel en la función **cognitiva**, y que su estímulo puede causar **hipotermia**. Estos receptores regulan la liberación de serotonina desde los terminales nerviosos en las neuronas del *locus cereleus* que inervan el hipocampo (integrante del sistema límbico que regula el estado afectivo) (Ruffolo y Hieble, 1994), y se han desarrollado antagonistas α_2 adrenérgicos como el idazoxan para su uso en el tratamiento de la **depresión nerviosa**.

Parece que existen también receptores α_1 adrenérgicos en el SNC, pero su localización es distinta de la localización de los receptores α_2 centrales. Los receptores α_1 adrenérgicos centrales están localizados principalmente en regiones sensoriales y motoras del SNC que reciben la mayoría de las terminaciones nerviosas adrenérgicas del *locus cereleus* (Greenberg et al., 1976; Miach et al., 1980). Gracias a los estudios de "binding" se comprobó que estos receptores estaban también presentes en el cordón espinal. Estudios realizados después de clonar y estudiar los distintos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos, localizaron ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de receptores α_1 adrenérgicos también en hipocampo y cortex (Wilson y Minneman, 1989; Zilles et al., 1991; Ruffolo y Hieble, 1994). Los receptores α_1 adrenérgicos centrales aparecen fundamentalmente a nivel postsináptico y median respuestas excitadoras, pero su participación en el control del tono vascular permanece aún sin esclarecer.

Cabe pensar que podrían existir algunas **diferencias** entre los receptores α adrenérgicos **periféricos** y los receptores α adrenérgicos centrales. Originalmente Schmitt, tras sus estudios con la clonidina y otros derivados imidazolínicos, pensó que ambas poblaciones de receptores α adrenérgicos, los periféricos y los centrales, constituían entidades bastante diferentes (Schmitt, 1971). Posiblemente el arsenal de agonistas y antagonistas α adrenérgicos de que se disponía entonces era sin embargo bastante limitado, y los estudios que podían realizarse con ellos también lo eran. Algunos investigadores llevando a cabo ensayos de "binding" publicaron años después que los receptores α_1 adrenérgicos del SNC eran en realidad muy similares a los receptores del mismo tipo localizados a nivel periférico en las estructuras vasculares (Timmermans et al., 1981c; Hieble et al., 1982). Sin embargo, como ya hemos mencionado, los receptores α_1 adrenérgicos centrales no tienen un papel relevante en el control de la PA, o al menos no median el efecto hipotensor y la bradicardia que ocasionan la clonidina y fármacos relacionados. Los estudios que comparaban la potencia de la clonidina y fármacos relacionados para actuar a nivel central y para sus efectos periféricos, también sugerían una estrecha similitud entre ambas poblaciones de receptores α_2 , los centrales y los periféricos (Timmermans et al., 1981b; De Jonge et al., 1982). El grupo de Timmermans sugirió incluso un modelo hipotético de receptor α_2 adrenérgico como el sitio de

acción de la clonidina e imidazolininas relacionadas (Timmermans et al., 1980) y este modelo tenía una estructura química muy similar al modelo clásico para los receptores α_2 adrenérgicos periféricos propuesto por Belleau (Ueda et al., 1978).

1.1.3.- Subtipos de los receptores α adrenérgicos

Tanto los receptores α_1 adrenérgicos, como los receptores α_2 adrenérgicos, se sabe hoy día que no representan poblaciones homogéneas, pudiendo subdividirse unos y otros en distintos subtipos. Hemos visto, que los estudios más útiles para la identificación de los receptores α adrenérgicos han sido los que evalúan la función fisiológica de sus agonistas y antagonistas. Estos estudios permitieron localizar inicialmente los sitios sensibles a los fármacos adrenérgicos, y permitieron además establecer el tipo de receptor implicado de acuerdo en cada respuesta. Con la aparición de las técnicas de "binding" se avanzó mucho, y se pudieron corroborar los resultados de los estudios funcionales. Estas técnicas permitieron además localizar e identificar receptores adrenérgicos en sitios insospechados, y sirvieron para comprobar que en un mismo órgano efector podían coexistir varios tipos y varios subtipos de un mismo receptor en diversa proporción. Con la incorporación de la biología molecular como herramienta de investigación, se ha logrado un gran avance en la clasificación de los receptores, y especialmente se ha logrado una definición más clara de los subtipos de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos. De ellos nos ocuparemos a continuación. Hay que tener en cuenta que algunos estudios recientes en esta línea, intentan incluso asociar el polimorfismo genético de los receptores α adrenérgicos y de sus distintos subtipos, con la probabilidad de aparición de algunas enfermedades vasculares y con la aparición de respuestas farmacológicas anómalas (Freeman et al. 1995; Svetkey et al., 1996; Lerman et al., 1998; Büscher et al., 1999).

Caracterización de los subtipos del receptor α_1 adrenérgico

Los estudios funcionales llevados a cabo por McGrath y Ruffolo aportaron las primeras evidencias de la existencia de dos subtipos distintos de receptores α_1 adrenérgicos (McGrath, 1982; Ruffolo, 1985). Algo después Morrow y Creese basándose en los resultados de sus estudios de "binding", sugirieron una subclasificación de los receptores α_1 adrenérgicos en α_{1A} y α_{1B} (Morrow y Creese, 1986). Estos investigadores establecieron los distintos perfiles de afinidad que presentaban una serie de agonistas α_1 adrenérgicos, tales como oximetazolina, y algunos antagonistas α_1 adrenérgicos, tales como fentolamina y el compuesto WB-4101 para los receptores. Distintos investigadores hicieron estudios más tarde con otros antagonistas α_1 adrenérgicos específicos como cloroetilclonidina (CEC) y prazosin, y sus resultados también

pusieron de manifiesto la existencia de dos poblaciones distintas de receptores α_1 adrenérgicos (Han et al., 1987; Johnson y Minneman, 1987; Minneman et al., 1988). Explicaremos más adelante los distintos procesos bioquímicos que tienen lugar para la transducción de la señal que sigue a la activación del receptor α_1 adrenérgico. Queremos ahora señalar que caracterizando estos procesos bioquímicos también se encontraron diferencias que indicaban la existencia de dos receptores α_1 adrenérgicos distintos (Timermans et al., 1983; Minneman, 1988; Graham et al., 1995). De este modo, se definió el subtipo α_{1A} como el receptor que tenía una gran afinidad por oximetazolina, fentolamina y el compuesto WB-4101, y que era insensible a la inactivación con CEC. Este receptor α_1 adrenérgico además dependía en gran medida de la entrada de calcio extracelular para la transducción de la señal, y se expresaba preferentemente en la arteria renal (Han et al., 1990), conductos deferentes, hipocampo y corteza cerebral de rata. A su vez, el subtipo α_{1B} mostraba muy poca afinidad por oximetazolina, fentolamina y el compuesto WB-4101, se inactivaba completa e irreversiblemente por CEC, y dependía en mayor grado de la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares para la transducción de la señal. Se expresaba además principalmente en hígado, bazo y corteza cerebral de rata, en líneas celulares de músculo liso vascular de hámster y en líneas celulares del tiroides de rata (Minneman et al., 1988; Shimura et al., 1990; Terman et al., 1990).

Los primeros estudios sobre la distribución de los subtipos del receptor α_1 adrenérgico aportaron de todos modos datos bastante confusos, ya que en muchas de las zonas estudiadas coexistían varios subtipos y no existían aún ligandos con una elevada selectividad por unos y por otros. Además, en ocasiones los resultados eran distintos entre distintas especies. Así por ejemplo, cuando se estudió la distribución del receptor α_1 adrenérgico en el hipocampo con técnicas de autoradiografía, se vio que en el hipocampo de la rata los distintos subtipos se distribuían de forma homogénea, pero por el contrario en el hipocampo del hombre los receptores α_{1A} y α_{1B} se distribuían de forma diferente (Zilles et al., 1991). Otra de las técnicas para el estudio de la distribución de los subtipos del receptor α_1 adrenérgico fue el análisis de su respectivo ARNm por técnicas de electroforesis ("Northern Blot"). Los datos que aportaron estos estudios parecieron inicialmente bastante consistentes con los datos de los estudios de "binding" y con los datos de los estudios funcionales. Los niveles del mensajero para el subtipo α_{1A} eran más abundantes en los conductos deferentes, y también se detectaban niveles significativos en el hipocampo, la corteza cerebral, la aorta, el tallo encefálico, el corazón, y el bazo de rata. Sin embargo el mensajero para el subtipo α_{1B} se distribuía de distinta forma, detectándose sobre todo niveles elevados en el hígado, y también en el corazón, la corteza cerebral, el tallo encefálico, el riñón, el pulmón y el bazo de rata. Existían no obstante

algunas discrepancias entre los datos que aportaban las técnicas de análisis de ARNm y los que aportaban los estudios funcionales y los estudios de "binding". Así por ejemplo, en el bazo de rata había más ARNm para el subtipo α_{1A} que para el α_{1B} , pese a que aparentemente este órgano sólo expresaba el subtipo α_{1B} . Algo parecido pasaba con la aorta de rata. Este tejido tenía mayores niveles de mensajero para el subtipo α_{1A} y no se detectaba en él mensajero para el subtipo α_{1B} , pero sin embargo la aorta de rata siempre había parecido que expresaba el subtipo α_{1B} en los ensayos funcionales. Todo ello hizo pensar que los niveles de ARNm para un receptor detectados por las técnicas de "Northern Blot" podían en realidad no ser un buen indicador de su densidad en un tejido.

La clasificación de los receptores α_1 en receptores α_{1A} y α_{1B} ocasionó por otra parte bastante confusión cuando se empezaron a clonar estos receptores. Entonces se consiguieron aislar, identificar y expresar una serie de genes que codificaban para receptores α_1 adrenérgicos, y al menos uno, y posiblemente dos de los receptores así definidos, no encajaban en lo que a sus propiedades se refería con los subtipos definidos previamente a partir de los estudios de "binding". Los tres subtipos clonados fueron: el subtipo α_{1b} , aislado a partir de una línea celular de músculo liso vascular de hámster (Cotecchia et al., 1988); el subtipo α_{1c} , aislado en el cerebro de bovino (Schwinn et al., 1990); y el subtipo α_{1d} , aislado en la corteza cerebral de rata (Lomasney et al., 1991; Pérez et al., 1991). La dificultad inicial para identificar los subtipos clonados con los definidos previamente por sus características farmacológicas se solventó más adelante, y quedó acordado lo siguiente. El subtipo clonado como α_{1b} era idéntico al subtipo α_{1B} definido farmacológicamente (Graham et al., 1995; Hieble et al., 1995a). El subtipo clonado como α_{1d} , que inicialmente se identificó con el subtipo α_{1A} por el parecido farmacológico entre ambos (Lomasney et al., 1991), era en realidad un nuevo subtipo no reconocido en los ensayos de afinidad realizados hasta entonces, ya que a diferencia del α_{1A} tenía muy poca afinidad por oximetazolina, y a diferencia del α_{1B} era sólo parcialmente sensible a CEC. Por ello, se le llamó provisionalmente subtipo $\alpha_{1a/d}$ (Schwinn et al., 1991; Hieble et al., 1995a). Más adelante, también se vio que este subtipo $\alpha_{1a/d}$, además de expresarse en la corteza cerebral de rata, se expresaba en una gran variedad de tejidos tales como el músculo liso vascular de rata, y posiblemente también en el pulmón de rata (Lomasney et al., 1991; Pérez et al., 1991; Hiramatsu et al., 1994). Este subtipo parecía el principal responsable de la vasoconstricción en la arteria ilíaca y en la aorta de rata (Piascik et al., 1994, 1995; Saussy et al., 1994), y en base a todas estas aportaciones al final se acordó definirle como subtipo α_{1D} . En lo que respecta al subtipo clonado como α_{1c} algunos investigadores también creyeron inicialmente que este receptor era en realidad el homólogo del subtipo definido farmacológicamente como α_{1A} , y por tanto pensaron que debería ser renombrado

como $\alpha_{1a/c}$ (Forray et al., 1994; Laz et al., 1994; Pérez et al., 1994; Price et al., 1994; Rokosh et al., 1994; Clarke et al., 1995; Hieble et al., 1995a). Este receptor parecía el principal responsable de la vasoconstricción en la arteria mesentérica y en la arteria renal de rata (Piascik et al., 1995). De todos modos tras quedar establecido este nuevo concepto, muchos se preguntaron porqué no se había clonado un subtipo que correspondiese claramente al subtipo definido farmacológicamente como α_{1A} . Algunos investigadores de hecho concluyeron que aún no se había clonado este receptor (Schiwnn y Lomasney, 1992; Minneman y Esbenshade, 1994). Hoy día sin embargo parece existir un acuerdo general para aceptar que ese subtipo clonado como α_{1c} es en realidad el subtipo α_{1A} . Por todo ello, actualmente la clasificación de los receptores α_1 adrenérgicos en subtipos ha quedado establecida de la siguiente manera: subtipo α_{1A} (clonado α_{1c} y renombrado $\alpha_{1a/c}$), subtipo α_{1B} (clonado α_{1b}) y subtipo α_{1D} (clonado α_{1d} y renombrado $\alpha_{1a/d}$) (Docherty, 1998b).

Existieron también bastantes dificultades para establecer la distribución de cada uno de estos tres receptores α_1 en los distintos órganos y tejidos, y también fue difícil definir la respuesta funcional que mediaba cada uno en las distintas especies estudiadas. Ya antes de clonar los receptores se había visto que los estudios de detección de ARNm podían ser confusos por la escasez del mensajero, y aunque después se intentaron mejorar las técnicas con el uso de controles internos, seguía resultando fácil la detección de falsos positivos (Laz et al., 1994; Pérez et al., 1994). A pesar de todo, con las distintas técnicas usadas se llegó a establecer que el subtipo α_{1A} se expresaba principalmente en el corazón e hígado del hombre, y también se expresaba en el corazón, en el pulmón, en los conductos deferentes y en las glándulas salivares de rata, pero no se expresaba ni en el bazo ni en el hígado de rata. Los estudios funcionales y de "binding" habían indicado que el subtipo α_{1A} mediaba principalmente la contracción en los vasos del riñón de rata, pero sin embargo su expresión fue muy variable y pobre cuando se midieron los niveles de su ARNm en este órgano (Clarke et al., 1995). La expresión del subtipo α_{1A} era sin embargo muy abundante en el hígado de conejo (Schwinn et al., 1991). Se llegó también a la conclusión de que la expresión del mensajero para el subtipo α_{1B} era elevada y uniforme en el corazón e hígado de rata, pero era pobre o nula en el hipocampo, glándula salivar y aorta de rata. Esto último coincidía con los resultados de los ensayos funcionales y de "binding", pues la contracción en la aorta de rata se pensaba que no estaba mediada por el subtipo α_{1B} . Se aceptó también que el subtipo α_{1D} se expresaba claramente en los conductos deferentes y en la aorta de rata, así como en la aorta del hombre. Se expresaba muy pobremente por el contrario en el hígado del hombre y en el hígado de rata, así como en el riñón, el bazo y la glándula salivar de rata (Faure et al., 1995).

Los estudios sobre las funciones que mediaba cada subtipo del receptor α_1 establecieron que el subtipo α_{1A} se encargaba de mediar respuestas ionotrópicas positivas en los miocitos cardíacos de la aurícula derecha de rata (junto con el subtipo α_{1B}) (Yu y Han, 1994; Endoh, 1996; Nagashima et al., 1996), y también que mediaba las contracciones de la arteria uterina de cerdo (Nair y Dyer, 1996), las de la arteria de la cola de rata (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Lachnitt et al., 1997), las de la arteria de la oreja de conejo (junto con otro subtipo distinto del receptor α_1) (Fagura et al., 1997), las de la arteria renal de rata (junto con el subtipo α_{1D}) (Lachnitt et al., 1997; Villalobos-Molina et al., 1997), las de la arteria mesentérica de perro (Daniel et al., 1999; Kwan, 1999) y de rata (Stassen et al., 1997); y las de las venas umbilicales del hombre (Errasti et al., 1999). Este subtipo también mediaba las contracciones del cuerpo cavernoso de rata (Tong y Cheng, 1997), las de los conductos deferentes del hombre (Moriyama et al., 1997), las de los conductos deferentes de rata (Burt et al., 1998; Docherty, 1998a), las de la próstata del hombre (junto con el subtipo α_{1B}) (Marshall et al., 1995) y las de la uretra del hombre (Taniguchi et al., 1997). El conocimiento de la función que tiene el receptor α_{1A} a este nivel, ha permitido el desarrollo de fármacos selectivos para el tratamiento de la "hipertrofia benigna prostática". Es sin embargo probable que los antagonistas α_{1A} que han resultado muy selectivos en los estudios de "binding", tengan poca potencia en los estudios funcionales (Chess-Williams, 1996; Taniguchi et al., 1997). Se ha visto que el subtipo α_{1A} está también implicado en las respuestas hipotensoras centrales que ocasiona el compuesto B-HT 920 (Ricci y Taira, 1999). También se ha descrito que el estímulo de este receptor facilita la actividad de las motoneuronas espinales de rata (Wada et al., 1997).

El subtipo α_{1B} media a su vez las contracciones de los miocitos cardíacos de la aurícula derecha de rata (junto con el subtipo α_{1A}) (Yu y Han, 1994; Nagashima et al., 1996), las de la próstata del hombre (junto con el subtipo α_{1A}) (Teng et al., 1994), las del bazo de rata (Burt et al., 1995; Noble et al., 1997), las del bazo de ratón (Eltze et al., 1996a), las de las vénulas del músculo esquelético de rata (Leech y Faber, 1996), las de la arteria uterina de cerdo (Nair y Dyer, 1996), las de la aorta torácica de rata (Stassen et al., 1997), las del cuerpo cavernoso de conejo (Noble et al., 1997), las de las arterias de resistencia cutáneas de conejo (junto con otro subtipo distinto del receptor α_{1B}) (Smith et al., 1997) y las de la aorta de perro (Daniel et al., 1999; Kwan et al., 1999). Este subtipo también media las respuestas presoras en la preparación de "pithed mouse" (ratón descerebrado y desmedulado) (McCafferty et al., 1999). El grupo de Piascik estableció que este subtipo del receptor α participaba más en las respuestas a los agonistas exógenos, y por el contrario el subtipo α_{1A} parecía estar más implicado en el mantenimiento del tono basal y de la PA en los animales conscientes (Piascik et al., 1990).

El subtipo α_{1D} mediaba las respuestas de la arteria ilíaca de rata (Piascik et al., 1995), las de las arteriolas del músculo esquelético de rata (Leech y Faber, 1996), las de la arteria carótida de rata (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996), las de la aorta de rata (Piascik et al., 1995; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Hussain y Marshall, 1997), las de la arteria mesentérica de rata (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Hussain y Marshall, 1997), las de la arteria pulmonar de rata (junto con otros subtipos del receptor α_1) (Hussain y Marshall, 1997), las de la aorta de conejo (Fagura et al., 1997), las de los miocitos del ventrículo de conejo (junto con otros subtipos del receptor α_1) (Yang y Endoh, 1997), las de la arteria renal de rata (junto con el subtipo α_{1A}) (Villalobos-Molina et al., 1997) y las de la vena mesentérica de perro (Daniel et al., 1999; Kwan, 1999). Este subtipo parece que también media en parte las contracciones de la aorta de perro, aunque allí el principal receptor es el subtipo α_{1B} (Daniel et al., 1999; Kwan, 1999). También media las respuestas presoras en la preparación de “pithed mouse” (McCafferty et al., 1999).

Los estudios con ratones “knock-out” permiten estudiar mejor las funciones que media cada subtipo de receptor adrenérgico. Para conseguir este tipo de modelos experimentales se manipula el material genético de determinadas proteínas, y en este caso se manipula el de los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico, de forma que estos ratones no expresan un subtipo determinado. Estos estudios han permitido saber por ejemplo que la contracción en la arteria de la cola de ratón está mediada principalmente por el receptor α_{1D} , ya que las contracciones de este vaso en los ratones que no expresaban este subtipo del receptor α_1 se desarrollaban más lentamente (Daly et al., 1998). Lo que parece claro es que las contracciones de un gran número de tejidos, y entre ellos el músculo liso, están mediadas por más de un subtipo de receptor adrenérgico, y los antagonistas disponibles hoy día no son lo suficientemente selectivos como para interaccionar funcionalmente con uno solo.

Desde luego hay pocos ligandos que reconozcan un solo subtipo del receptor α_1 . Merece sin embargo la pena destacar la selectividad de algunos. Algunos compuestos que muestran selectividad por el subtipo α_{1A} son el 5-metilurapidil, la (+)niguldipina, la oximetazolina y los compuestos A-61603, SNAP5089, KMD-3213 y RS17053 (Boer et al., 1989; Hancock et al., 1994; Pérez et al., 1994; Hieble et al., 1995a; Knepper et al., 1995; Wetzel et al., 1995). Entre los compuestos con selectividad por el subtipo α_{1B} tenemos la espiperona, la respiperona, la risperidona y el compuesto AH11110A. Inicialmente se pensó que la espiperona y la respiperona eran ligandos muy selectivos (Ford et al., 1994), pero hoy día se sabe que su afinidad por este receptor es sólo un 5-10 % mayor que la que muestra por los restantes

subtipos α_1 (Sauusy et al., 1994). Inicialmente los estudios de “binding” también sugirieron que la risperidona era un antagonista selectivo para el receptor α_{1B} (Sleight et al., 1993), pero esta selectividad ha sido cuestionada en distintos estudios funcionales (Eltze, 1996b). El compuesto AH11110A podría ser quizá más útil para identificar este receptor, ya que muestra un 30% más de afinidad por él que por el resto de los subtipos del receptor α_1 (King et al., 1994). Algunos compuestos también se vio que eran selectivos para el subtipo α_{1D} . Entre ellos figuran el compuesto BMY 7378 y el compuesto SKF 105854 (Saussy et al., 1994; Hieble et al., 1995a). El compuesto BMY 7378 es un antagonista selectivo del receptor α_{1D} , pero al igual que sucede con muchos otros compuestos, en los ensayos funcionales no muestra la misma selectividad que en los ensayos de “binding” (Docherty, 1998b). La **tabla 2I** (página 34), muestra los ligandos selectivos para los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico. Los perfiles farmacológicos de los distintos subtipos se vio que no variaban mucho entre las distintas especies animales, con excepción del subtipo α_{1A} de bovino y el subtipo α_{1A} de rata para los cuales los fármacos tenían distinta afinidad (Pérez et al., 1994). En cualquier caso, la falta de especificidad de los distintos ligandos por cada subtipo de receptor limita su utilización *in vivo*.

Tabla 2I: Ligandos selectivos para los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico.

Ligandos	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Agonistas	oximetazolina A-61603		
Antagonistas	5-metil-urapidil (+)niguldipina SNAP5089 KMD-3213 RS17053	AH11110A	BMY 7378 SKF 105854

Una vez definidas las funciones que regulaban los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico, pareció importante investigar si era posible manipular su expresión génica de forma independiente, ya que ello podía tener obvias implicaciones en terapéutica. Se ha estudiado sobre todo como se regula la expresión del subtipo α_{1B} (Ishac et al., 1992). Los ensayos experimentales en rata reflejaron que la densidad de los receptores α_{1B} , podía sufrir cambios mayores que la densidad de los receptores del subtipo α_{1A} con estas manipulaciones. Así por ejemplo, en la corteza cerebral el tratamiento con reserpina causó un 40% de incremento en la densidad de receptores α_{1B} , y el tratamiento con desipramina causó un 24% de disminución en la densidad de estos receptores, pero la densidad de los receptores α_{1A} no

se alteró con estos tratamientos (Hanft y Gross, 1990; Shimura et al., 1990). Eckhart y colaboradores pudieron también comprobar que la disminución en los niveles de oxígeno en situaciones de hipoxemia o isquemia, podía incrementar selectivamente la expresión del subtipo α_{1B} en los vasos sanguíneos arteriales (Eckhart et al., 1996). Del mismo modo se ha visto que la expresión de este subtipo α_{1B} puede alterarse en situaciones patológicas y en concreto que experimenta una regulación a la alta en las células renales del túbulo distal durante el desarrollo de HTA (Gesek, 1999). También algunos estudios experimentales recientes han demostrado que los tres subtipos del receptor α_1 pueden afectarse de forma independiente cuando están expresados en la misma célula y se lleva a cabo un tratamiento con determinados agonistas (Yang et al., 1999).

Hay que señalar que también existe otra clasificación distinta de los receptores α_1 basada en los ensayos de algunos investigadores que demostraron que no todos los receptores α_1 adrenérgicos tenían la misma afinidad por el prazosin (Holck et al., 1983; Medgett y Langer et al., 1984; Flavahan y Vanhoutte et al., 1986). En estos ensayos se reconocieron dos grupos de receptores α_1 adrenérgicos, aquellos con alta afinidad por el prazosin, que se denominaron α_{1H} , y aquellos con baja afinidad por el prazosin, que se denominaron α_{1L} . Muramatsu y colaboradores en 1990 definieron otro subtipo denominado α_{1N} y establecieron tres grupos de receptores α_1 : el α_{1H} , el α_{1L} y el α_{1N} (Muramatsu et al., 1990). Estos mismos investigadores más tarde comprobaron que el subtipo α_{1H} coincidía por su perfil farmacológico con los subtipos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , no encajando por el contrario el perfil farmacológico de los subtipos α_{1L} y α_{1N} con el de ninguno de los receptores clonados (Muramatsu et al., 1995). Pese a ello, se han publicado distintos trabajos sobre tejidos muy variados que contienen el receptor α_{1L} . Este receptor aparece en los conductos deferentes de rata (junto con el subtipo α_{1A}) (Ohmura et al., 1992; Muramatsu et al., 1994), y aparece también en la aorta de conejo, en la arteria mesentérica de rata, en la arteria carótida de rata (Muramatsu et al., 1990; Van der Graaf et al., 1996), en la aorta de cobaya, en las glándulas paratiroides de rata, en el íleon de cobaya, en la mucosa nasal de cobaya, en la próstata del hombre y del perro (Hieble, 1995a; Muramatsu et al., 1995), en las arterias de resistencia cutáneas de conejo (junto con el subtipo α_{1B} , subtipo que predomina en este tejido) (Smith et al., 1997), en la uretra del hombre (Taniguchi et al., 1997), en la vejiga de conejo (Kava et al., 1998), en la arteria pulmonar de perro (junto con el subtipo α_{1B}) (Flavahan et al., 1998) y en la arteria mesentérica de perro (junto con el subtipo α_{1A}) (Daniel et al., 1999; Kwan et al., 1999). Por todo ello, se sugirió que este receptor α_{1L} podía ser una variante del subtipo α_{1A} . Las propiedades farmacológicas de éste último sabemos que son muy parecidas en las distintas especies estudiadas (Shibata et al., 1996). Se ha señalado también que el subtipo α_{1L} y el subtipo α_{1A} podrían ser distintos

estados conformacionales de un mismo receptor que sería en realidad el α_{1A} . Esta idea surgió de algunos ensayos funcionales que presentaban para este receptor α_{1L} dos posibles perfiles de afinidad característicos respectivamente de los subtipos α_{1A} y α_{1L} (Ford et al., 1997). Hay sin embargo que reconocer que en cualquier caso sería necesario clonar el subtipo α_{1L} y completar los estudios sobre este receptor para poder incluirlo como subtipo adicional dentro de la clasificación de los receptores α_1 actualmente aceptada (Ford et al., 1994; Muramatsu et al., 1995; Graham et al., 1996).

Las **tablas 3I y 4I** (páginas 37 y 38), reflejan la distribución de los subtipos del receptor α_1 adrenérgico en base a los datos que aportan los estudios realizados con distintas técnicas.

Tabla 3I: Distribución de los subtipos del receptor α_1 en distintas especies. Los datos se han obtenido a partir de ensayos funcionales y/o de "binding".

Tejido	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	α_{1L}
SNC (CC, Hipocampo)	b, r	r	r	
Tejido vascular ("pithed mouse")		rn	rn	
CMLV		ha	r	
Aorta		p, r	p, c, co, r	co, cb
Arteria carótida			r	r
Arteria ilíaca			r	
Arteria renal	r		r	
Arteria pulmonar		p	r	p

Arteria uterina	c	c		
Arteria mesentérica	p, r		r	p, r
Arteria de la cola	r		rn	
Arteria de la oreja	co			
Arterias resistencia cutáneas		co		co
Arteriolas músculo cremáster			r	
Vena safena				p
Vena mesentérica			p	p, c, r
Vena umbilical	h			
Vénulas músculo cremáster		r		
Aurícula derecha	r	r		
Ventrículo			co	
Hígado		r		
Bazo		r, rn		
Ileon				cb
Paratiroides				r
Mucosa nasal				cb
Vejiga			co, r	co
Conductos deferentes	h, r		r	r
Uretra	h			h
Cuerpo cavernoso	r	co		
Próstata	h	h		h, p, r

SNC: Sistema nervioso central; CC: Corteza cerebral; CMLV: Líneas celulares del músculo liso vascular. h: hombre, p: perro, c: cerdo, co: conejo, cb: cobaya, r: rata, rn: ratón.

Tabla 4I: Distribución de los subtipos del receptor α_1 en distintas especies. Los datos se han obtenido a partir de ensayos que miden niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

Tejido	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Corteza cerebral	b*, r ⁺	r ⁺	r [*]
Hipocampo	r ⁺	r ⁺	
Tallo encefálico	r ⁺	r ⁺	
CMLV		ha*	
Aorta	r ⁺⁺	r ⁺	[h, r] ⁺⁺
Arteria renal	r ⁺		
Corazón	[h, r] ⁺⁺	r ⁺⁺	

Pulmón	r ⁺⁺	r ⁺	
Hígado	[h, c] ⁺⁺	r ⁺⁺	[h, r] ⁺
Bazo	r ⁺⁺ ?	r ⁺	r ⁺
Riñón		r ⁺	r ⁺
Conducto deferente	r ⁺⁺		r ⁺⁺
Glándula salivar	r ⁺⁺	r ⁺	r ⁺

CMLV: Líneas celulares de músculo liso vascular. h: hombre, b: bovino, c: conejo, ha: hámster, r: rata. Aparecen con un asterisco las localizaciones donde dichos subtipos se clonaron por primera vez. ++: Cantidades abundantes y regulares de ARNm, +: Cantidades muy pobres e irregulares de ARNm. ?: Desacuerdo en los distintos estudios que miden niveles de ARNm para este subtipo.

Caracterización de los subtipos del receptor α_2 adrenérgico

En la década de los 80 se empezó a considerar la posibilidad de que existiese también una heterogeneidad entre los receptores α_2 adrenérgicos y distintos investigadores abordaron esta idea (Timmermans y Van Zwieten, 1982; Bylund, 1985, 1988ab; McGrath et al., 1989). En un principio, los receptores α_2 adrenérgicos se subclasificaron en dos subtipos en base a las distintas afinidades de una serie de agonistas y antagonistas ensayados en los estudios de "binding". El subtipo α_{2A} era el que se encontraba principalmente en las plaquetas humanas, y el subtipo α_{2B} aparecía en el pulmón de ratas neonatas, en la corteza cerebral de rata y en el riñón de rata. Estos dos subtipos del receptor α_2 también se identificaron en los cultivos de distintas líneas celulares (Bylund et al., 1988). Estudios adicionales con medidas del mensajero intracelular adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), confirmaron estos resultados de los estudios de "binding" (Bylund y Ray-Prenger, 1989). Posteriormente pudo identificarse un tercer subtipo del receptor α_2 llevando a cabo ensayos de "binding" en el riñón de opossum y en líneas celulares procedentes de este órgano (células OK) (Murphy y Bylund, 1988; Blaxall et al., 1991). A este subtipo se le llamó α_{2C} . Se identificó además un nuevo subtipo del receptor α_2 en las glándulas submaxilares de rata (Michel et al., 1989). Este cuarto subtipo del receptor α_2 adrenérgico, con propiedades farmacológicas completamente distintas de las de los subtipos α_2 definidos hasta el momento, se identificó posteriormente también en la glándula pineal de bovino (Simonneauz et al., 1991), y se acordó que se denominase subtipo α_{2D} . Hay que tener en cuenta de todos modos que la falta de agonistas selectivos para los distintos subtipos del receptor α_2 hizo que los primeros estudios sobre su distribución resultasen bastante confusos. Desafortunadamente los estudios iniciales de cuantificación de los niveles de su ARNm tampoco fueron muy esclarecedores, ya que la expresión de estos receptores en las distintas especies utilizadas era muy variable (Lorenz et al., 1990). Por todo ello, al igual que en el caso de los receptores α_1 adrenérgicos, no se estableció una clasificación farmacológica consistente

hasta que se introdujeron las técnicas de clonaje. Con ellas también se consiguió aislar e identificar mejor a los distintos subtipos del receptor α_2 .

Los subtipos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} definidos desde el punto de vista farmacológico se aislaron y se identificaron también con técnicas de clonaje, al menos en dos especies distintas, en el hombre y en la rata. Lefkowitz y su grupo en 1987 (Kobilka et al., 1987) fueron los primeros en aislar, secuenciar y expresar el gen que codificaba para el subtipo α_{2a} , cuyas propiedades farmacológicas eran idénticas a las del subtipo definido previamente como α_{2A} y lo hicieron partiendo de un homogeneizado de plaquetas humanas. El gen se encontraba localizado en el cromosoma 10 dentro del genoma humano, y por ello estos investigadores le llamaron subtipo α_{2C-10} . Más adelante se clonó otro subtipo del receptor α_2 adrenérgico en la rata. Este presentaba de nuevo un gran parecido en sus afinidades farmacológicas y también en su estructura química con el subtipo α_{2A} (Chalderberg et al., 1990; Lannier et al., 1991). Sin embargo, trabajos posteriores demostraron que aunque este clon aislado en la rata tenía la misma estructura que el del humano, sus afinidades farmacológicas eran claramente distintas (Harrison et al., 1991; Lanier et al., 1991). Algunos investigadores sugirieron que podía tratarse de un subtipo adicional del receptor α_2 adrenérgico, y le denominaron subtipo α_{2d} (Lanier et al., 1991). Mientras tanto, el grupo investigador de Lynch, seguía afirmando que se trataba del homólogo en la rata del subtipo α_{2A} de las plaquetas humanas (Harrison et al., 1991). De forma casual se comprobó que el subtipo α_{2D} , ya identificado en la glándula pineal de bovino y en las glándulas submaxilares de rata, mostraba unas propiedades farmacológicas que parecían encajar bastante bien con las de este subtipo en controversia. Por ello, se acabó aceptando que este receptor era un nuevo subtipo del receptor α_2 adrenérgico, el subtipo α_{2D} , independiente del de las plaquetas humanas (Lanier et al., 1991). En realidad hoy día se acepta que los subtipos α_{2D} y α_{2A} son variantes entre especies de un mismo receptor (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995b; Docherty, 1998b). Por este motivo en algunos estudios este receptor se denomina α_{2A} , en otros α_{2D} y en otros $\alpha_{2A/D}$. En esta revisión nosotros denominaremos a este receptor subtipo $\alpha_{2A/D}$. El grupo investigador de Lefkowitz identificó y aisló otro subtipo del receptor α_2 en el genoma humano (Regan et al., 1988). Sus propiedades farmacológicas eran muy similares, aunque no idénticas, a las del subtipo α_{2C} ya definido a partir de líneas celulares OK. Algo más tarde se aisló su homólogo en rata (Flordellis et al., 1991; Voigt et al., 1991), y al final se aceptó que este receptor coincidía con subtipo α_{2C} ya definido anteriormente. En los estudios de clonaje se le llamó por lo tanto el subtipo α_{2c} . Hay que señalar por último que al comenzar la década de los 90 también se pudo aislar el gen que codificaba para el subtipo α_{2B} en el hombre (Lomasney et al., 1990; Weinshank et al., 1990) y en la rata (Zeng et al., 1990).

En la década de los 90 se intentó además diseñar ligandos selectivos para los distintos subtipos del receptor α_2 adrenérgico. La oximetazolina y la guanfacina son agonistas selectivos para el subtipo $\alpha_{2A/D}$, pero no existen agonistas selectivos para los otros subtipos. Existen por el contrario antagonistas selectivos para los distintos subtipos del receptor α_2 . Los compuestos BRL44408 y BRL 48962 son antagonistas selectivos para el subtipo $\alpha_{2A/D}$ (Beeley et al., 1995; Wikberg-Matssan et al., 1995; Gavin et al., 1997), el imiloxan y el compuesto ARC 239 son antagonistas selectivos para el subtipo α_{2B} (Bylund et al., 1988) y la rauwolscina y el compuesto MK 912 lo son para el subtipo α_{2C} (Hieble et al., 1995b; Uhlen et al., 1997). La **tabla 5I** (página 41), muestra los ligandos selectivos para los distintos subtipos del receptor α_2 adrenérgico. Hay que tener en cuenta de todos modos que la selectividad de los distintos ligandos *in vivo* siempre resulta menor que la que muestran los distintos compuestos en los estudios de “binding”, y por ello los estudios funcionales no han permitido diferenciar claramente el tipo de función que media cada subtipo del receptor α_2 adrenérgico. Como veremos a continuación varios estudios experimentales permitieron sin embargo llegar a conocer algunas de estas funciones.

Tabla 5I: Ligandos selectivos para los distintos subtipos del receptor α_2 adrenérgico.

Ligandos	$\alpha_{2A/D}$	α_{2B}	α_{2D}
Agonistas	oximetazolina guanfacina		
Antagonista	BRL44408 BRL 48962	imiloxan ARC 239	rauwolscina MK 912

Se sabe hace tiempo que los receptores α_2 adrenérgicos en el músculo liso vascular, son responsables, al igual que los receptores α_1 adrenérgicos, de las respuestas vasoconstrictoras. Los resultados de los ensayos en las preparaciones de “pithed rat” y “pithed mouse” sugieren que el principal receptor α_2 implicado en las respuestas vasoconstrictoras es el subtipo $\alpha_{2A/D}$. También parece que este receptor media principalmente las respuestas

hipotensoras de los agonistas α_2 . De hecho, estos fármacos no ocasionan respuestas hipotensoras en ratones “knock-out” que no expresan el subtipo $\alpha_{2A/D}$ (MacMillan et al., 1996). Así pues, el receptor $\alpha_{2A/D}$ mediaría ambas respuestas, la respuesta hipotensora central y la respuesta vasoconstrictora periférica de los agonistas α_2 , pero los efectos centrales de estos fármacos predominan en los animales conscientes. Otros subtipos del receptor α_2 , especialmente el α_{2B} , pueden jugar también un papel importante en las respuestas vasoconstrictoras de los agonistas α_2 , y se vio que dichas respuestas no aparecían en ratones “knock-out” que no expresaban este subtipo del receptor α_2 (Link et al., 1996). Algunos estudios recientes señalan que las respuestas presoras en la preparación de “pithed mouse” están mediadas principalmente por los receptores α_1 y por este receptor α_{2B} (McCafferty et al., 1999). Otros estudios experimentales con ratones “knock-out” han permitido también actualmente saber que este receptor α_{2B} juega un papel relevante en el desarrollo de HTA (Kable et al., 2000).

A diferencia de lo que acontece en las arterias, sabemos que el principal receptor responsable de la contracción de las venas es el receptor α_2 adrenérgico, y por eso se han utilizado sobre todo preparaciones de venas para establecer el papel que juegan los distintos subtipos del receptor α_2 en la vasoconstricción adrenérgica. El subtipo α_{2C} se vio que mediaba la vasoconstricción de la vena safena humana (Gavin et al., 1997). Por el contrario, el subtipo $\alpha_{2A/D}$ parecía que era el principal receptor responsable de la vasoconstricción de la vena safena de perro (MacLennan et al., 1997). Parece en realidad que los subtipos $\alpha_{2A/D}$ y α_{2B} controlan más la contracción arterial y el subtipo α_{2C} sería responsable sobre todo de la vasoconstricción venosa. También algunos ensayos con preparaciones aisladas han reflejado que el subtipo $\alpha_{2A/D}$ media en parte la vasoconstricción de las arteriolas y vénulas del músculo “cremáster” de rata (Leech y Faber, 1996).

En otros músculos lisos, y más concretamente en el miometrio, coexisten ambos receptores, el $\alpha_{2A/D}$ y el α_{2B} , en igual proporción. Algunos estudios sobre la regulación de estos receptores durante el embarazo así lo demuestran (Bouet Alard et al., 1997). El receptor $\alpha_{2A/D}$ es responsable también de la inhibición de la liberación de insulina en los islotes pancreáticos de rata (Niddam et al., 1990). La **tabla 6I** que aparece en esta misma página, refleja la distribución de los subtipos del receptor α_2 postsináptico en base a los datos que aportan los estudios funcionales.

Tabla 6I: Distribución de los subtipos del receptor α_2 postsináptico en distintas especies. Los datos se han obtenido a partir de ensayos funcionales.

Tejido	$\alpha_{2A/D}$	α_{2B}	α_{2C}
Sistema nervioso central	r, rn		
Tejido vascular ("pithed rat-mouse")	r, rn	r, rn	
Vena safena	p		h
Arteriolas-vénulas músculo cremáster	r		
Miometrio	h	h	
Células β páncreas	r		

h: hombre, p: perro, r: rata, rn: ratón.

También se corresponden con el subtipo $\alpha_{2A/D}$ los receptores α_2 presinápticos de las terminaciones adrenérgicas de las glándulas submaxilares de rata (Limberger et al., 1992; Smith et al., 1992; Smith y Docherty, 1992), los de los conductos deferentes de rata (Smith et al., 1992; Smith y Docherty, 1992), los de la corteza cerebral de rata (Tredelenberg et al., 1993), los del riñón de rata (Bohmann et al., 1993) y los de la aurícula de ratón (Wahl et al., 1996; Ho et al., 1998). Así mismo, también son receptores $\alpha_{2A/D}$ los receptores α_2 presinápticos encontrados en la corteza cerebral de conejo (Tredelenberg et al., 1993), los encontrados en la arteria mesentérica de perro (Daniel et al., 1995), en la corteza cerebral humana (Raiteri et al., 1992) y en la vena safena humana (Molderings y Gothert, 1995). Los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos centrales que median las respuestas analgésicas, sedantes e hipotérmicas que ocasiona dexmetomidina son también receptores $\alpha_{2A/D}$ (Hunter et al., 1997). Un estudio actual utilizando ratones "knock-out" corrobora que el subtipo $\alpha_{2A/D}$ media los efectos presinápticos de los agonistas α_2 tales como la hipotensión, sedación, analgesia e hipotermia, y sugiere que este receptor podría mediar también un leve efecto anestésico (Kable et al., 2000).

Algunos estudios indican que a nivel presináptico se pueden localizar sin embargo otros receptores α_2 distintos de los $\alpha_{2A/D}$. Se han localizado receptores α_{2C} a nivel presináptico en la corteza del riñón humano (Tredelenberg et al., 1994; Michel y Rump, 1996) y en la aurícula derecha humana (Rump et al., 1995; Ho et al., 1998). Algunos estudios experimentales recientes con ratones "knock-out" también sugieren que a nivel presináptico existen receptores $\alpha_{2A/D}$ y α_{2C} (Hein y Kobilka, 1998). Así mismo, el subtipo α_{2C} parece estar implicado en numerosos efectos centrales tales como el reflejo de sobresalto, la respuesta de estrés y la locomoción (Kable et al., 2000). Ambos subtipos, el $\alpha_{2A/D}$ y el α_{2C} , son importantes para promover la inhibición presináptica de la liberación de NA, pero el papel de cada uno de ellos

en el control o regulación de estos procesos podría ser distinto (Kable et al., 2000). Algunos estudios permiten además afirmar que todos los subtipos del receptor α_2 adrenérgico, tanto los pre- como los postsinápticos, son muy similares en lo que a sus propiedades farmacológicas se refiere, entre las distintas especies animales estudiadas, y también son similares los de la especie humana (Svensson et al., 1996).

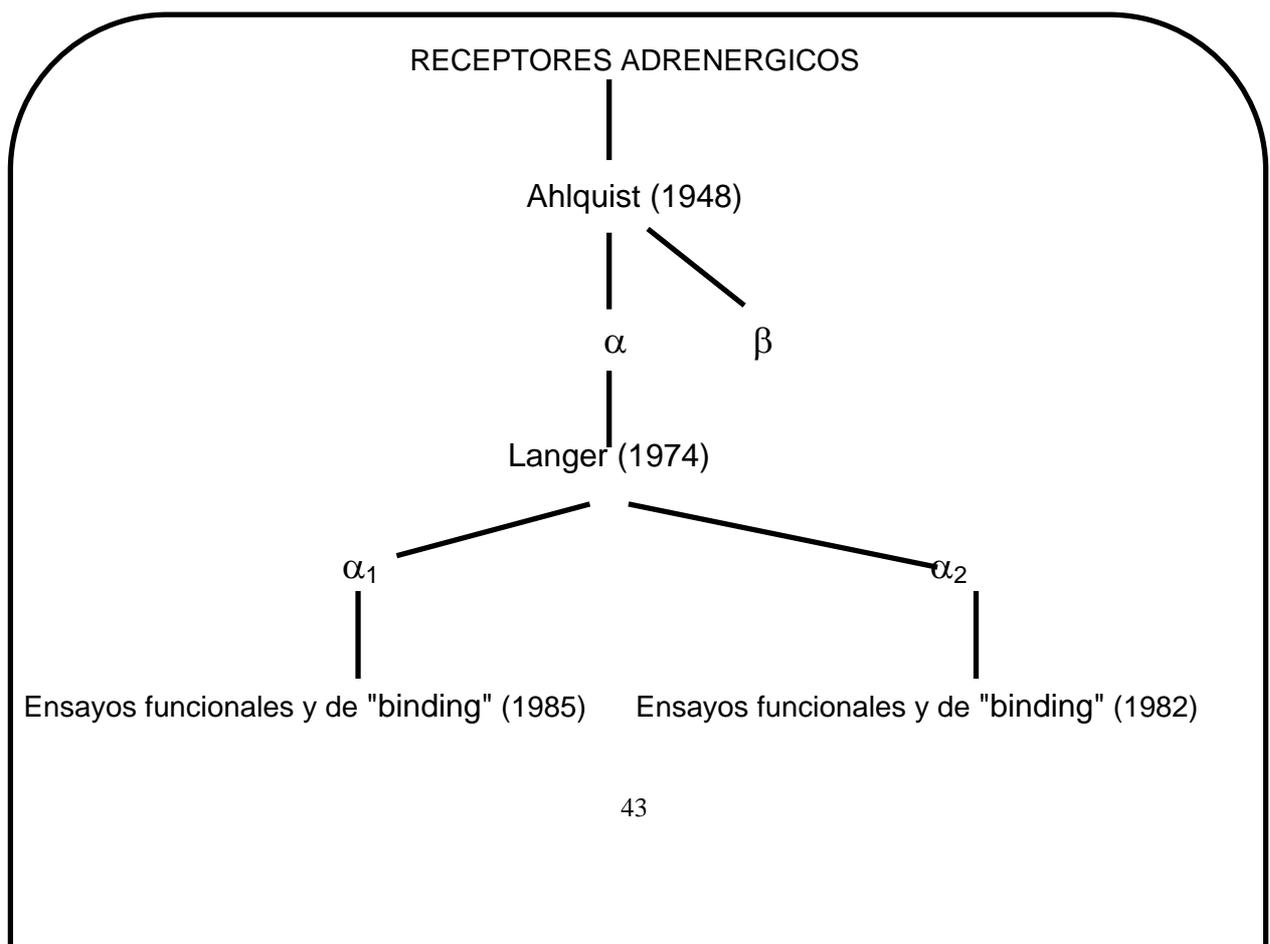
La **tabla 71** (página 44), refleja la distribución de los subtipos del receptor α_2 presináptico sobre la base de los datos que aportan los estudios funcionales.

Tabla 71: Distribución de los subtipos del receptor α_2 presináptico en distintas especies. Los datos se han obtenido a partir de ensayos funcionales.

Tejido	$\alpha_{2A/D}$	α_{2B}	α_{2C}
Corteza cerebral	h, c, r		h, rn
Tallo encefálico	h, rn		
Aurícula derecha	rn		h
Arteria mesentérica	p		
Vena safena	h		
Riñón	r		h
Conductos deferentes	r		
Glándulas submaxilares	r		

h: hombre, p: perro, c: conejo, r: rata, rn: ratón.

La **figura 1I** (página 45), representa de forma simplificada la historia de la división y subdivisión de los receptores adrenérgicos, desde sus comienzos hasta la clasificación actual que acepta la existencia de distintos subtipos de estos receptores.



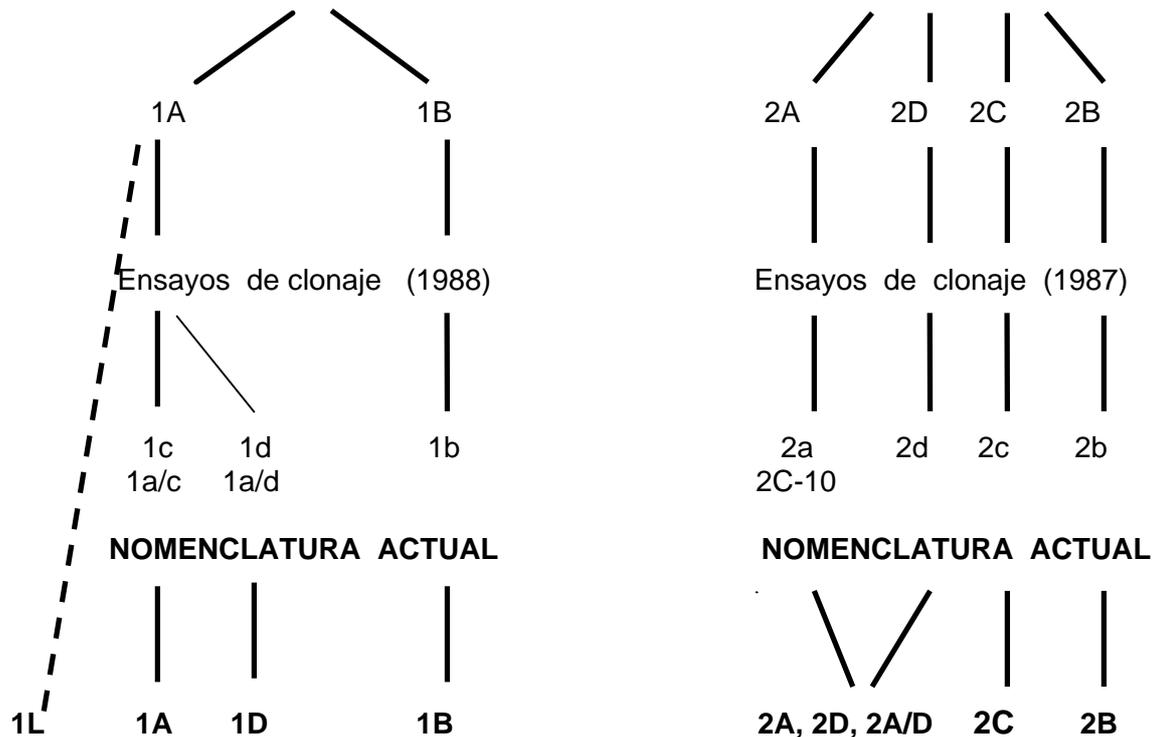


Figura 11: Historia de la clasificación de los receptores α adrenérgicos. Entre paréntesis figuran las fechas de la división inicial de estos receptores y del comienzo en la utilización de distintas técnicas para su clasificación en subtipos.

1.1.4.- Estructura química de los receptores α adrenérgicos

Todos los receptores α adrenérgicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, y poseen la estructura característica común con el resto de los miembros de esta familia (Iismaa et al., 1994; Graham et al., 1995). Además, todos los receptores α adrenérgicos muestran un patrón estructural muy similar al de las "opsinas", un grupo de proteínas retinianas asociadas también a proteínas G que se activan por la luz. Tienen por tanto una cadena polipeptídica de unos 500 aminoácidos, 7 segmentos de unos 20-25 aminoácidos de carácter hidrofóbico con estructura de α -hélice, que se localizan dentro de la membrana plasmática. Usualmente estos segmentos hidrofóbicos contienen una serie de residuos aminoacídicos que son funcionalmente muy importantes para la unión de los agonistas endógenos (NA y Ad) o exógenos (Riek et al., 1995). Esta interacción puede verse afectada por una serie de factores. Las distintas concentraciones intracelulares de los iones Na^+ y Mg^{2+} pueden modificar por ejemplo la unión de algunos ligandos al receptor (Pihlavisto et al., 1998). Estos segmentos hidrofóbicos se encuentran a su vez conectados con 6 bucles hidrofílicos que se extienden alternativamente a ambos lados de la membrana (Dohlman et al.,

1987; Lefkowitz y Caron, 1988; Strader et al., 1989). El extremo N-terminal se localiza en el medio extracelular, y sus residuos determinan la adecuada inserción de la proteína receptor en la membrana plasmática. El extremo C-terminal está en el interior de la célula. Parece que en él, y en los residuos del tercer bucle intracelular se localizan las zonas responsables de la interacción entre el receptor y la proteína G (Dixon et al., 1987; O'Dowd et al., 1988; Franke et al., 1992; Wong y Ross, 1994). También a este nivel se localizan los aminoácidos implicados en los procesos de desensibilización o taquifilaxia del receptor. Esta desensibilización del receptor se sabe que tiene lugar a través de la fosforilación de residuos de serina/treonina por proteínas kinasas (García-Sainz, 1993). A continuación comentaremos algunos aspectos más concretos sobre la estructura de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos.

Estructura del receptor α_1 adrenérgico

Los receptores α_1 adrenérgicos son glicoproteínas con un peso molecular (Pm) próximo a 80 kd a que están constituidos por una cadena polipeptídica sencilla de 429-561 aminoácidos. Aproximadamente el 30% de su estructura son carbohidratos, y se han identificado en el extremo N-terminal varios sitios posibles de glicosilación en la secuencia primaria de la proteína (Leeb-Lundberg et al., 1984; Lomasney et al., 1986; Shreeve, 1988). La estructura del receptor α_1 adrenérgico es muy similar a la de la "rodopsina", receptor de la retina encargado de la transducción de la señal para hacer posible la visión diurna, y a la de la "bacteriorodopsina", la bomba de protones activada por la luz en el *Halobacterium halobium*. Su estructura es también similar a la estructura de los receptores β adrenérgicos (Riek et al., 1995). Se conocen cuatro familias de proteínas G, y el receptor α_1 adrenérgico está en principio acoplado a proteínas $G_{q/11}$ "insensibles a las toxinas *colérica* y *pertussis*" (Minneman, 1988; Berridge et al., 1989; Wu et al., 1992).

Existen además diferencias estructurales entre los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico. En primer lugar, hay que señalar que sólo se ha demostrado la glicosilación en los residuos del extremo N-terminal para el subtipo α_{1B} (Sawutz et al., 1987), es posible sin embargo que al menos el subtipo α_{1D} también esté glicosilado. La longitud de este extremo N-terminal varía también considerablemente entre los distintos subtipos. La longitud N-terminal del subtipo α_{1D} es mayor (90 aminoácidos). Esto probablemente limite la inserción del receptor en el sarcolema, siendo por tanto este subtipo el que más pobremente se expresa en la membrana plasmática. Por el contrario, el receptor α_{1A} es el que tiene una longitud del extremo N-terminal menor (25 aminoácidos) (Kost et al., 1994). Probablemente existe también una selectividad entre los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico para acoplarse a distintos

miembros de la familia de las proteínas $G_{q/11}$ (Wu et al., 1992). Esto explicaría a su vez la diversidad en los sistemas efectores intracelulares. Cuando se estimulan receptores α_{1B} las proteínas G_q , G_{11} , G_{14} y G_{16} median los efectos sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos. Los receptores α_{1D} se acoplan sin embargo sólo a proteínas G_q o G_{11} (Wu et al., 1992). No está del todo claro a pesar de todo el tipo de proteína G que está acoplado a cada subtipo de receptor α_1 adrenérgico (Graham et al., 1996). Como ya hemos dicho, en principio todos los receptores α_1 están acoplados predominantemente a proteínas $G_{q/11}$ “insensibles a toxina *pertussis*”. Estudios en aorta de rata así lo han demostrado, pero en estos mismos estudios se vio que el subtipo α_{1B} podía acoplarse además a proteínas G_o “insensibles a toxina *pertussis*” (Gurdal et al., 1997). Algunos investigadores trabajando con tejido nativo (Nebigil et al., 1992) y con clones de los receptores α_1 adrenérgicos expresados en modelos eucarióticos (Pérez et al., 1993), han demostrado también que los distintos subtipos del receptores α_1 adrenérgico pueden activar múltiples sistemas efectores a través de su acoplamiento a proteínas $G_{i/o}$ “sensibles a toxina *pertussis*”. Existen incluso trabajos muy recientes que sugieren que los receptores α_1 adrenérgicos podrían interactuar con otras proteínas intracelulares distintas de las proteínas G (Zhong y Minneman, 1999).

Estructura del receptor α_2 adrenérgico

Los receptores α_2 adrenérgicos son proteínas de unos 450 aminoácidos con un Pm próximo a 67 kd. Esta proteína se aisló y purificó por primera vez en las plaquetas humanas (Kobilka et al., 1987). La principal diferencia entre estos receptores y los receptores α_1 adrenérgicos radica en el tercer bucle intracelular, que en este caso es mucho más largo y tiene aproximadamente 150 aminoácidos. Esta diferencia es importante porque como ya hemos señalado, este tercer bucle intracelular está implicado en el acoplamiento del receptor a la proteína G (Dixon et al., 1987; O’Dowd et al., 1988). La longitud de este tercer bucle es aproximadamente 2-3 veces la longitud del mismo bucle en los receptores α_1 y en los receptores β adrenérgicos, pero sin embargo la longitud de este bucle es muy parecida en los receptores α_2 y en el receptor muscarínico. Esta analogía es interesante también, ya que como veremos la activación de ambos receptores, los α_2 y los muscarínicos, está asociada a una inhibición en la actividad del enzima adenilato ciclasa (Peralta et al., 1987). Los receptores α_2 adrenérgicos también se diferencian de los receptores α_1 adrenérgicos en el extremo C-terminal, que en el caso de los receptores α_2 es mucho más corto. El receptor α_2 adrenérgico es además un receptor acoplado a la familia de proteínas $G_{i/o}$ “sensible a la toxina *pertussis*” (Boyer et al., 1983; Docherty, 1990b) α_2 adrenérgicos pueden sin embargo acoplarse también

proteínas G_s “sensibles a toxina *colérica*”(Ullrich & Wollheim, 1984; Fraser et al., 1989; Cottechia et al., 1990; Duzic et al., 1992; Chabre et al., 1994; Jansson et al., 1995; Nasman et al., 1997). La proteína G del receptor α_2 adrenérgico presináptico puede ser además distinta. Las proteínas G de estos receptores son en principio proteínas $G_{i/o}$ “sensibles a la toxina *pertussis*” (Allgaier et al., 1986; Delmas et al., 1998). Se ha comprobado sin embargo que las proteínas G implicadas en la liberación de neurotransmisores mediada por los receptores α_2 presinápticos en cultivos de neuronas simpáticas de rata (Schwartz, 1997), en la aurícula de ratón (Musgrave et al., 1987) y en los conductos deferentes de rata (Docherty et al., 1988a; Borton y Docherty, 1990), son “insensibles a toxina *pertussis*”.

Hasta este momento no existen estudios concluyentes que demuestren la existencia de diferencias estructurales entre los distintos subtipos del receptor α_2 . Si existen estas diferencias, probablemente serán menos marcadas que las que presentan los distintos subtipos del receptor α_1 . Distintos ensayos con tejidos donde se expresan los subtipos del receptor α_2 demuestran que los tres se encuentran desde luego acoplados a proteínas $G_{i/o}$ “sensibles a toxina *pertussis*” (Fraser et al., 1989; Chabre et al., 1994; Wright et al., 1995). Algunos ensayos recientes han reflejado sin embargo que existe una cierta selectividad por las proteínas G de los distintos subtipos del receptor α_2 adrenérgico de forma que los subtipos α_{2A} y α_{2C} se acoplan únicamente a proteínas G_i , y sin embargo el subtipo α_{2B} se acopla a ambas proteínas, las G_i y las G_s (Pohjanoksa et al., 1997). Existen además en la actualidad un gran número de estudios farmacológicos que intentan localizar posibles puntos de interacción farmacológica con los subtipos α_2 para diseñar ligandos más específicos de estos receptores (Marjamaki et al., 1998).

La **figura 2l** que aparece en esta página, representa la estructura del receptor α adrenérgico.

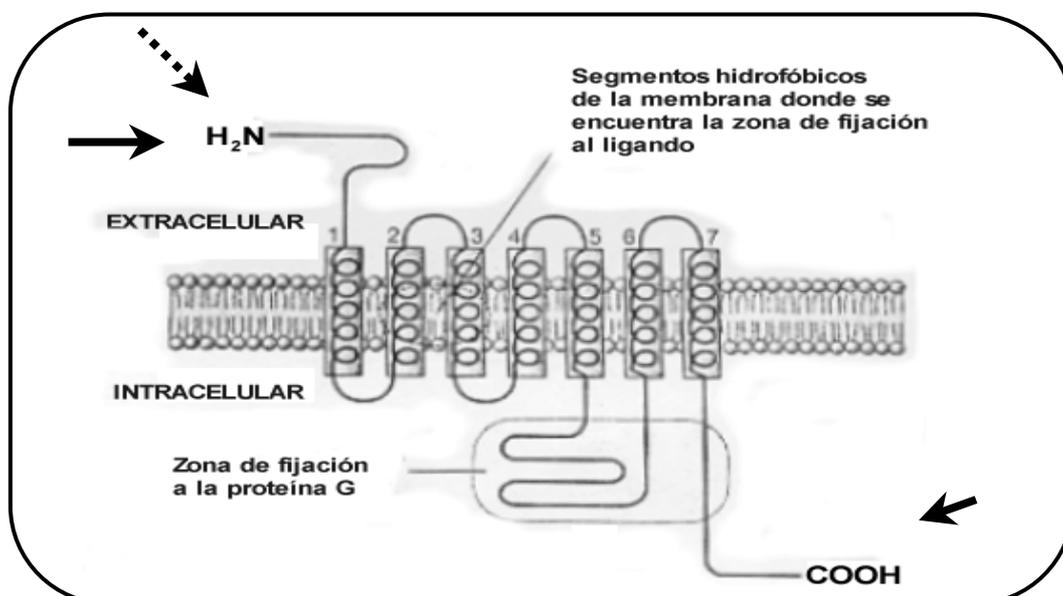




Figura 21: Esquema de la estructura del receptor α adrenérgico. Se indican los puntos donde aparecen diferencias estructurales entre los distintos tipos con una flecha continua y el punto donde aparecen diferencias estructurales entre los subtipos del receptor α_1 adrenérgico con una flecha discontinua.

1.1.5.- Mecanismos de transducción de la señal

Se sabe que existen diferencias en las vías utilizadas para la transducción de la señal que conduce a la respuesta biológica después de la estimulación de los receptores α_1 y después de la estimulación de los receptores α_2 adrenérgicos, especialmente en lo que a los movimientos iónicos se refiere, y en particular al movimiento del ion calcio (Casteels, 1978; Van Breemen et al., 1978). Bohr hace ya años observó que sólo una parte de la contracción producida por la Ad en la aorta aislada de conejo era dependiente de la concentración extracelular de calcio (Bohr, 1963). Los estudios en la preparación de "pithed rat" aportaron más tarde información de suma utilidad sobre la participación del calcio extracelular e intracelular en la vasoconstricción mediada por estímulo de los receptores α_1 y α_2 postsinápticos vasculares. Los registros de PA tras la administración de agonistas α_1 y α_2 adrenérgicos selectivos en esta preparación, reflejaban las diferencias que siguen a la formación del complejo agonista α adrenérgico-receptor α adrenérgico para llegar a generar el estímulo. El incremento presor obtenido con metoxamina (agonista selectivo α_1 adrenérgico) tenía un componente fásico rápido y elevado pero su componente tónico era de corta duración, recuperándose los niveles basales de PA con cierta rapidez. En los incrementos presores tras la administración de un agonista selectivo α_2 adrenérgico el componente fásico prácticamente no existía y el de mayor duración era el tónico. Estas diferencias pudieron explicarse cuando se evaluó la influencia que los antagonistas del calcio tenían sobre dichas respuestas presoras. Estos compuestos constituyeron herramientas farmacológicas de elevada utilidad para estos estudios ya que bloquean la entrada de calcio extracelular a la célula por canales específicos para este ion localizados en las células del músculo liso vascular. Se pudo comprobar que la respuesta presora tras la activación del receptor adrenérgico α_2 se debía a la entrada de calcio extracelular, ya que era extremadamente sensible al tratamiento con estos fármacos. Por el contrario, la respuesta presora observada tras la activación del receptor adrenérgico α_1 no dependía tanto del calcio extracelular, y era sólo parcialmente sensible al tratamiento con antagonistas del calcio (Van Meel et al., 1981ab, 1982ab; Timmermans et al., 1983). Los estudios de este grupo de investigación en la preparación de los miembros posteriores de rata

perfundidos corroboraron también que la vasoconstricción α_1 adrenérgica era insensible al tratamiento con los antagonistas del calcio (Van Meel et al., 1983). Otros grupos de investigación trabajando también con la preparación de “pithed rat” propusieron además la existencia de receptores α_1 de reserva. Estos receptores jugaban un papel en las respuestas vasoconstrictoras cuando se administraba un antagonista del calcio, y estas respuestas resultaban por ello insensibles al tratamiento (Reid et al., 1983; Ruffolo y Yaden, 1984; Ruffolo et al., 1984). Algunos trabajos del grupo de Timmermans en esta misma preparación de “pithed rat” demostraron más tarde que algunos agonistas α_1 , denominados por estos investigadores “agonistas parciales”, eran capaces de comportarse como los agonistas α_2 , resultando su efecto susceptible al bloqueo por los antagonistas del calcio. Para estos investigadores el calcio que se utilizaba cuando se producía una vasoconstricción por los agonistas α_1 adrenérgicos podía tener claramente un doble origen, de forma que para la contracción muscular se utilizaba calcio extracelular y se movilizaba calcio intracelular, resultando por ello el efecto α_1 sensible sólo en parte al bloqueo de la entrada de calcio a la célula (McGrath y O’Brien, 1987; Richer et al., 1987; Timmermans y Thoolen, 1987; Timmermans et al., 1987). A continuación expondremos en forma más detallada los movimientos del calcio y los procesos bioquímicos que conducen a la respuesta cuando se estimulan los receptores α_1 y los receptores α_2 adrenérgicos, y abordaremos también las diferencias que puede presentar la transducción de la señal cuando se estimulan los distintos subtipos de estos receptores.

Transducción del estímulo α_1 adrenérgico

Los procesos implicados en la contracción vascular cuando se estimulaban los receptores α_1 adrenérgicos se estudiaron sobre todo en distintas preparaciones de arterias aisladas. Se propusieron varias hipótesis, pero al igual que los estudios anteriormente mencionados, la mayor parte de los estudios *in vitro* parecían reflejar también que la contracción α_1 era resistente a los antagonistas del calcio. Se pudo comprobar que las respuestas tónicas de los agonistas de estos receptores en las arterias aisladas dependían del calcio extracelular, pero los canales por los que entraba este ión a la célula eran distintos de los canales que mediaban la contracción cuando se administraba un agente despolarizante como el KCl (Meisheri et al., 1981; Loutzenhiser y Van Breemen, 1983). El grupo de Godfraind llegó a la conclusión de que la formación del complejo agonista α_1 adrenérgico-receptor α_1 adrenérgico inducía una despolarización de la membrana por alteración en el flujo de iones Na^+ y K^+ , y por ello no era sensible a los antagonistas del calcio. Esta despolarización inducía la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, en especial desde el retículo sarcoplásmico y desde un pequeño depósito localizado en la cara interna del sarcolema. Probablemente por este

motivo no se requería una entrada sustancial de calcio a través de la membrana para que se produjese la contracción (Godfraind y Miller, 1982; Godfraind et al., 1982). Cauvin y Van Breemen establecieron que la NA podía inducir una entrada del calcio sin producir despolarización del músculo liso vascular y ésto sucedía porque se rectificaban las permeabilidades de otros iones como por ejemplo la corriente de salida de K^+ (Cauvin y Van Breemen, 1985). Todo ello justificaba que en la mayoría de los casos la vasoconstricción mediada por los agonistas α_1 adrenérgicos selectivos fuese insensible a los antagonistas del calcio. Todos los anteriores resultados contrastaban sin embargo con los resultados obtenidos por el grupo de Vanhoutte. Estos investigadores observaron que los agonistas α_1 producían una contracción sensible al bloqueo con antagonistas del calcio en distintos vasos aislados (Vanhoutte y Rimele, 1982; Vanhoutte, 1982). Las discrepancias entre los resultados obtenidos por los distintos investigadores se atribuyeron a las diferencias en el modelo experimental utilizado y a las condiciones del estudio, pudiendo condicionar sobre todo las respuestas el lecho vascular estudiado. La respuesta vasoconstrictora α_1 dependía en mayor grado del calcio extracelular cuando se utilizaban arterias de pequeño calibre. También se comprobó que la relativa contribución del calcio intra- y extracelular en la vasoconstricción α_1 adrenérgica variaba con las distintas especies (Cauvin y Malik, 1984; Cauvin et al., 1984; Bevan et al., 1986).

Leitjen y colaboradores en 1985 trabajando con aorta y con arteria mesentérica de conejo, explicaron con más detalle el proceso de utilización de calcio tras la activación α_1 adrenérgica. Estos investigadores propusieron que cuando estos receptores se estimulaban, se liberaba calcio de un pequeño depósito intracelular situado en la cara interna del sarcolema. Este calcio liberado no originaba directamente la contracción del miocito liso vascular, pero promovía la liberación de más calcio desde el retículo sarcoplásmico. Simultáneamente, el calcio almacenado en un depósito o reserva localizada en la cara externa del sarcolema, se liberaba también y penetraba en la célula a través de canales de calcio operados por receptor. Estos dos procesos eran responsables del componente fásico temprano de la contracción, y venían seguidos de una entrada de calcio extracelular que era responsable del componente tónico tardío de la contracción (Leitjen et al., 1985).

La utilización del calcio extra e intracelular se vio posteriormente que podía ser distinta además cuando se estimulaban diferentes subtipos del receptor α_1 adrenérgico (Hieble et al., 1986). Para Han y colaboradores el estímulo del receptor α_{1B} ocasionaba una contracción independiente del calcio extracelular, pero el estímulo del receptor α_{1A} ocasionaba por el

contrario una contracción dependiente de la entrada de este ion por canales sensibles a los antagonistas del calcio (Han et al., 1987).

Se siguen debatiendo las fuentes de calcio y las vías que utiliza este ion para entrar a la célula cuando se estimulan los receptores α_1 adrenérgicos. Estudios del grupo investigador de Minneman indican que tras la activación α_1 adrenérgica el calcio puede penetrar en la célula del músculo liso vascular por canales voltaje dependientes y también por canales no dependientes de voltaje (Minneman, 1988; Minneman y Esbenshade, 1994). Algunos estudios más recientes señalan que la contracción producida por estímulo α_1 es independiente de la entrada de calcio a través de canales voltaje dependientes (Hamada et al., 1997), pero existen también otros estudios actuales con microscopía confocal en arterias de resistencia de rata, que demuestran que la entrada de calcio extracelular a través de canales voltaje dependientes tipo L es totalmente necesaria para la contracción del miocito liso vascular resultante de la activación α_1 adrenérgica (Miriél et al., 1999). No hay que olvidar en cualquier caso que la liberación del calcio intracelular almacenado es prioritaria para la contracción arterial producida por los agonistas α_1 . Datos experimentales recientes desde luego confirman que el calcio de los depósitos intracelulares condiciona en mayor grado la contracción del miocito liso vascular que la entrada de este ion por canales voltaje dependientes y la consiguiente despolarización de la membrana celular (Bramich y Hirst, 1999).

Los movimientos del calcio cuando se estimulaban receptores α_1 adrenérgicos se entendieron mejor cuando se estudiaron los procesos bioquímicos que tenían lugar después de la activación de estos receptores. En la mayor parte de los sistemas la translocación de calcio tras el estímulo α_1 adrenérgico es consecuencia del metabolismo de los fosfatidilinositoles (PI) por activación del isoenzima β_1 de la fosfolipasa C (PLC) (Michell, 1979; Blank et al., 1992). Este isoenzima hidroliza el enlace éster-fosfato de los fosfolípidos de la membrana citoplásmica. Cuando se estimulan los receptores α_1 adrenérgicos se produce principalmente una hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), y se originan como productos resultantes de dicha hidrólisis dos compuestos, el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), que serán los segundos mensajeros para la transducción de la señal. Cada uno de estos mensajeros tendrá sin embargo una función distinta (Berridge, 1983, 1984). Por su fuerte carga eléctrica el IP_3 abandona la membrana y emigra por el citoplasma hasta el retículo sarcoplásmico, en cuya membrana activa un receptor específico que funciona como canal de calcio, provocando su apertura y la salida masiva de este ion al citoplasma (Suematsu et al., 1985; Berridge, 1993; Putney y Bird, 1993). El calcio actúa entonces como tercer mensajero, uniéndose a la calmodulina y produciendo la contracción. Campbell y colaboradores

relacionaron la liberación de calcio producida por IP_3 con el componente fásico temprano de la contracción de la aorta de conejo (Campbell et al., 1985). Se llegó a la conclusión de que la síntesis de IP_3 a partir de PIP_2 tenía lugar en la cara interna del sarcolema, en la zona donde se encontraba el calcio que se movilizaba según Leitjen inmediatamente después del estímulo de los receptores α_1 (Leitjen et al., 1985). El calcio inicialmente liberado desde este pequeño depósito ya sabemos que era responsable de la liberación posterior del calcio activador desde el retículo sarcoplásmico.

Hay que señalar también que la acción movilizador de calcio que tiene el IP_3 puede verse reforzada por su conversión en su metabolito tetrafosforilado, el inositol-1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP_4) (Irvine, 1992; Berridge, 1993). Ambos además tienen un metabolismo cíclico, de forma que vuelven a convertirse en PIP_2 por una serie de enzimas después de mediar los procesos intracelulares correspondientes. La liberación intracelular de calcio desde el retículo sarcoplásmico producida por ambos IP, el IP_3 y el IP_4 , o por el calcio inicialmente liberado del depósito del sarcolema, puede además promover la penetración secundaria de este ion desde el espacio extracelular hasta el interior de la célula a través de canales. En algunas células la entrada de calcio al interior celular no tiene lugar si no se produce IP_4 , pero hay que tener en cuenta que el IP_4 es sólo activo en presencia de su precursor metabólico el IP_3 . La liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico inducida por estos compuestos puede detectarse en realidad por un sensor localizado en su membrana, y este sensor a través de un mecanismo desconocido es capaz de originar una entrada de calcio extracelular a través de canales conocida como entrada capacitativa de calcio (Putney y Bird, 1993). Este sensor se inhibe por el propio calcio y se desinhibe cuando se vacía el depósito de calcio intracelular del retículo sarcoplásmico. La entrada de calcio extracelular indirecta y secundaria al vaciamiento del retículo sarcoplásmico producida por los IP, aseguraría la prolongación en el tiempo de la señal de calcio inducida por el agonista α_1 adrenérgico, y aseguraría el llenado adecuado de dicho depósito intracelular una vez que la acción del agonista cesa (Montero et al., 1991). Aunque no aumente la síntesis de IP, también puede tener lugar una activación de la entrada capacitativa de calcio cuando se produce un vaciamiento del retículo sarcoplásmico por otras maniobras tales como los tratamientos con tapsigargina o ionóforos de calcio, o la incubación prolongada en medio sin calcio (Putney y Bird, 1993). Se ha demostrado que esta entrada capacitativa de calcio se produce en un gran número de células (Putney, 1993), pero no se conoce bien la naturaleza de los canales responsables de la entrada de este ion (Hoth y Penner, 1992, 1993; Fasolato et al., 1994).

El DAG que también se origina cuando se hidroliza el PIP_2 , permanece en la membrana citoplasmática donde activa la proteín-kinasa C (PKC) (Kishimoto et al., 1980). Este enzima

citoplásmica antes de su activación se encuentra en el citoplasma en forma inactiva. Sin embargo, cuando aumenta la concentración intracelular de calcio por el efecto movilizador del IP_3 , la PKC es transferida al sarcolema, y allí se activa al fijarse a los fosfolípidos. Esta fijación se refuerza por el DAG y este mediador es indispensable en realidad para la plena activación del enzima. Hay una acción sinérgica por tanto entre el IP_3/Ca^{2+} y el DAG. La PKC actúa sobre muy diversos sustratos proteícos que incluyen canales de calcio reguladores de las concentraciones intracelulares de este ion, receptores para diversos mediadores, enzimas y factores de transcripción génica. Algunos investigadores señalaron que la PKC podía inducir la contracción tónica tardía del miocito liso vascular (Rasmussen et al., 1984) vía una interacción con la quinasa de la cadena ligera de la miosina (Nishikawa et al., 1984; Mita y Walsh, 1997). Sin embargo existen también estudios que mantienen que la contracción producida por estímulo α_1 es independiente del estímulo de la PKC (Hamada et al., 1997). Estudios en arterias cerebrales y en la arteria de la cola de la rata demostraron que la PKC podía activar también la PLD (Gu et al., 1992; Llahi y Fain, 1992). Se ha observado además mayor producción de AMPc tras la activación α_1 adrenérgica, y quizá este mediador aumenta después del estímulo α_1 porque el enzima adenilato ciclasa puede ser también un sustrato de la PKC (Schiwnn et al., 1991; Pérez et al., 1993; Ruan et al., 1998). Se ha sugerido además que la activación de la PKC podría estar implicada en la liberación de neurotransmisores que se produce cuando se estimulan los receptores α_1 presinápticos (Somogyi et al., 1996).

El DAG puede seguir dos rutas metabólicas. Se convierte en ácido fosfatídico (PA) por acción de la DAG-quinasa, o se metaboliza por lipasas y origina ácido araquidónico. El PA puede comportarse como un ionóforo del calcio (Tyson et al., 1976), originando también a su vez la contracción dependiente de calcio del miocito liso vascular (Salmon y Honeyman, 1980). Para Campbell y colaboradores el PA sería el responsable de la entrada de calcio extracelular en la aorta de conejo, y por tanto de su contracción tónica cuando se estimulan los receptores α_1 (Campbell et al., 1985). El papel preciso del DAG en el proceso de la contracción vascular no está sin embargo totalmente aclarado. El mismo puede también inducir directamente una entrada de calcio extracelular, sin que sea necesario para ello que se produzca su conversión en PA (Forder et al., 1985).

El estímulo α_1 adrenérgico puede originar además la activación de otras fosfolipasas distintas de la PLC. Este estímulo puede por ejemplo promover una activación de la PLA_2 mediada por proteínas $G_{i/o}$ "sensibles a toxina *pertussis*" (Pérez et al., 1993; Exton, 1996) y una activación de la PLD (Gu et al., 1992; Ruan et al., 1998). La PLA_2 es un enzima que sintetiza ácido araquidónico al hidrolizar otros fosfolípidos distintos de los fosfoinosítidos. Hidroliza por

ejemplo fosfatidilcolina y PA. El ácido araquidónico que así se forma, y que también se podía formar a partir del metabolismo del DAG, puede comportarse como segundo mensajero intracelular. Como tal, puede a su vez activar la PKC y la PLC, y puede incrementar la concentración de calcio intracelular, modular la actividad de canales iónicos, etc..... El ácido araquidónico y sus metabolitos pueden también amplificar o modular intracelularmente la acción de otros segundos mensajeros como son el AMPc y el guanosin monofosfato cíclico (GMPc). Es decir, que la activación de la PLA₂ por los agonistas α_1 tiene consecuencias similares a las que se derivan del estímulo de la PLC y el consiguiente metabolismo de los fosfoinosítidos. La activación de la PLD tras un estímulo α_1 adrenérgico origina así mismo la hidrólisis de fosfatidilcolina, produciendo PA y colina, pero parece que no implica procesos como la activación de la PKC o como la entrada de calcio extracelular, ya que se puede producir también en presencia de inhibidores de la PKC o tras una deplección de calcio (Gu et al., 1992; Llahi y Fain, 1992).

Recientemente se ha señalado que el estímulo del receptor α_1 adrenérgico podría facilitar los procesos de expresión proteica, promoviendo la transcripción y translación génica (Mark et al., 1990; Graham et al., 1996; Schluter et al., 1998). Parece que tras la activación α_1 adrenérgica se produce una inducción rápida en la expresión de los genes de determinados factores de transcripción como el *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*... (Starksen et al., 1986; Majesky et al., 1990). Otros estudios han encontrado una asociación entre el estímulo del receptor α_{1A} y la vía clásica de transducción de la señal de los factores de crecimiento, en la que se lleva a cabo la activación del protooncogen *Ras* y su cascada de kinasas correspondientes (Lee et al., 1988; Lazou et al., 1994). Aún no están claras las vías intracelulares que median estas respuestas, pero lo que sí parece claro es que la PKC se encuentra implicada. En el momento actual se está investigando la importancia de la estimulación α_1 adrenérgica en los procesos de crecimiento e hipertrofia celular. Se sabe que el estímulo α_1 puede causar proliferación de las células del músculo liso vascular, y ensayos recientes en cultivos de miocitos cardiacos han permitido también relacionar el estímulo α_1 y la activación de la PKC con la aparición de hipertrofia cardiaca (Karns et al., 1995; Yamazaki et al., 1998). Existe un interés creciente en la obtención de fármacos con afinidad por los receptores α_1 para modular estos procesos.

Algunos trabajos experimentales han estudiado comparativamente las vías de transducción de la señal cuando se estimulan los receptores α_1 adrenérgicos en ratas hipertensas y normotensas. Los resultados de estos estudios son en ocasiones contradictorios sin embargo, se pudo comprobar que la actividad del enzima PLC en corazón, riñón y vasos sanguíneos era usualmente mayor en las ratas hipertensas (Resink et al., 1987; Uehara et al.,

1987, 1988; Chen et al., 1992). Así mismo, la síntesis de IP tras la administración de NA era también mayor en los vasos sanguíneos de ratas hipertensas (Heagerty et al., 1986; Guild et al., 1992; Durkin et al., 1990). Otros estudios que medían la capacidad del IP₃ para liberar calcio desde el retículo sarcoplásmico, comprobaron que la unión de este segundo mensajero a sus receptores específicos en la membrana, era mayor en la aorta de ratas hipertensas que en la aorta de ratas normotensas (Bernier et al., 1993). También se pudo observar que el incremento en las concentraciones intracelulares de DAG tras una contracción con NA, era mayor en las ratas hipertensas jóvenes (Kondo et al., 1990; Okumura et al., 1990). Existe además una disminución en la actividad del enzima DAG-Kinasa en los eritrocitos de ratas hipertensas (Kato et al., 1987). Todo ello indica que en la HTA el aumento de las concentraciones intracelulares de DAG observado no tiene porque ser consecuencia necesariamente de una alteración en la actividad del enzima PLC. Los trabajos de algunos autores en los que se estudiaban los efectos contráctiles de una serie de forbolésteres (activadores del enzima PKC), demostraron que existía una mayor sensibilidad a los efectos de estos compuestos en los vasos de las ratas hipertensas que en los vasos de las ratas normotensas (Storm et al., 1990; Miyata et al., 1991; Silver et al., 1992).

Las vías de transducción de la señal cuando se estimulan distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico probablemente no son idénticas (Han et al., 1990; Michel et al., 1990; Suzuki et al., 1990; Daly et al., 1990; Minneman et al., 1994; Burt et al., 1996; Tabernero et al., 1996; Hu y Dyer, 1997; Mita y Walsh, 1997; Takayanagi et al., 1997). El estímulo de todos los subtipos se ha asociado a la activación de la PLC y también al estímulo de las otras dos fosfolipasas celulares, la PLA₂ y la PLD. Posiblemente los movimiento del calcio difieren sin embargo cuando se estimulan unos y otros (Schiwn et al., 1991; Pérez et al., 1993). En principio, el estímulo del subtipo α_{1A} podría facilitar la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes sin ocasionar la síntesis de IP, y el subtipo α_{1B} estimularía la formación de IP₃ y ocasionaría una movilización de calcio desde los depósitos intracelulares. Existen no obstante un gran número de estudios que han aportado excepciones a esta teoría. Aunque en la mayoría de los tejidos la activación del receptor α_{1B} ocasiona una movilización de calcio desde los depósitos intracelulares, su activación también se ha asociado con la entrada de calcio extracelular al interior de la célula, si bien esta entrada no tendría lugar por canales voltaje dependientes. Del mismo modo, algunos estudios han señalado que la activación del receptor α_{1A} podría también promover la formación de IP₃ (Sayet et al., 1993; Lazou et al., 1994). Datos experimentales recientes señalan además que la activación de los distintos subtipos del receptor α_1 adrenérgico podría estimular diferentes PKC (Taguchi et al., 1998).

La **figura 3I** (página 58), refleja la transducción de la señal tras el estímulo del receptor α_1 adrenérgico.

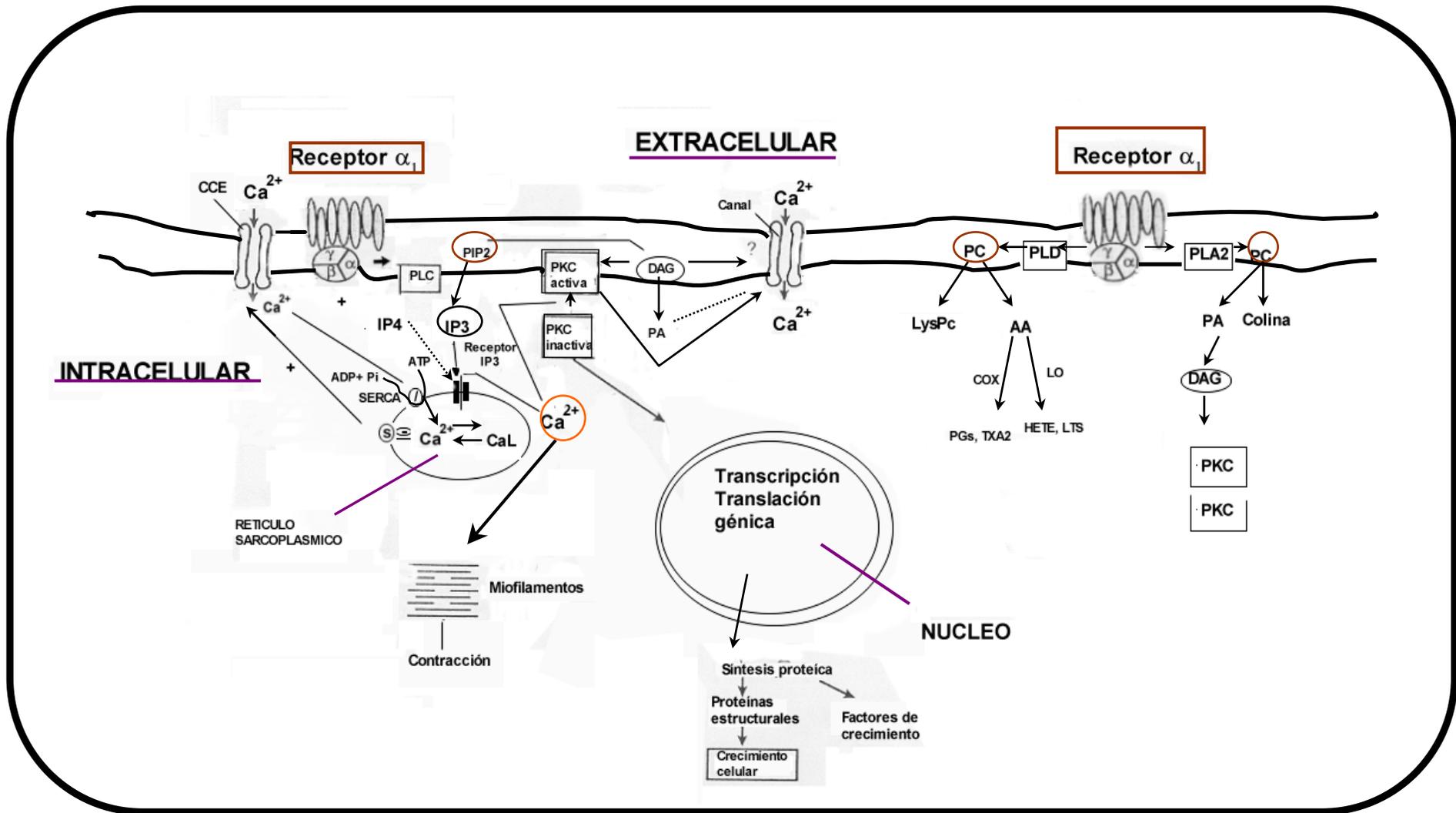


Figura 3I: Mecanismos de transducción para distintas respuestas cuando se estimulan los receptores α_1 adrenérgicos.

Transducción del estímulo α_2 adrenérgico

Los ensayos *in vitro* no siempre permitieron estudiar los movimientos del ion calcio tras la activación α_2 adrenérgica. Ya hemos señalado que en las preparaciones de tejido arterial las respuestas vasoconstrictoras mediadas por estos receptores son muy difíciles de observar. Una de las pocas arterias aisladas que permitieron estudiar la vasoconstricción mediada por los receptores α_2 adrenérgicos fue la arteria de la cola de la rata (Medgett y Rajanayagam, 1984; Medgett, 1985). Los ensayos con preparaciones venosas reflejaron algo mejor los procesos que seguían a la activación de estos receptores. Como ya sabemos, en este tipo de vasos la población de receptores α_2 adrenérgicos es más abundante y presenta además características distintas de las de la población de los receptores α_2 localizados en las arterias. La preparación venosa más utilizada fue la de la vena safena de perro. En ambas preparaciones, la de la arteria de la cola de la rata y la de la vena safena de perro, se corroboró de nuevo que la liberación de calcio intracelular no estaba implicada en la contracción del músculo liso vascular originada tras la activación α_2 adrenérgica, siendo por el contrario la entrada del calcio extracelular el principal mecanismo implicado en esta contracción (Jim y Matthews, 1985). Se postuló la siguiente hipótesis. La formación del complejo agonista α_2 adrenérgico-receptor α_2 adrenérgico genera un estímulo que conlleva una entrada de iones calcio desde el medio extracelular. Esto contribuye a la activación de proteínas contráctiles intracelulares, y lleva en último término a la contracción de la fibra del músculo liso vascular. El bloqueo de esta entrada de iones calcio con un antagonista del calcio sería capaz de impedir la vasoconstricción, pero no impediría la formación del complejo agonista α_2 adrenérgico-receptor α_2 adrenérgico (Van Meel et al., 1981). La entrada de calcio tras el estímulo de los agonistas α_2 adrenérgicos se pensó que podía conllevar la despolarización de la membrana, de forma que este ion entraría a través de canales voltaje dependientes. Los ensayos de Mathew y colaboradores en la vena safena de perro no reflejaron sin embargo grandes cambios en el potencial de membrana tras el estímulo α_2 (Matthews et al., 1984). Los datos aportados por otros investigadores en esta misma preparación indicaban sin embargo que al estimular los receptores α_2 adrenérgicos se producía una despolarización de la célula (Cheung, 1985a,b). Estudios en vasos de resistencia subcutáneos humanos demuestran que las contracciones α_2 adrenérgicas originan la entrada de calcio probablemente a través de canales voltaje dependientes (Parkinson y Hughes, 1995).

Tras la activación de los receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos, se originaba de un modo u otro, un incremento en las concentraciones de calcio intracelular. Esto no podía sin embargo suceder cuando se activaban los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos. Un aumento en las concentraciones de calcio intracelular no podía explicar la inhibición en la liberación de neurotransmisores producida por este estímulo. Cabía esperar que tras la activación α_2 adrenérgica presináptica tuviese lugar por el contrario un descenso en los niveles de calcio intracelular. Ensayos experimentales llevados a cabo en sinaptosomas corticales de rata así lo demostraron (Adamson et al., 1987). Se sugirió que la activación de los receptores α_2 presinápticos podía ocasionar una inhibición de la entrada de iones calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes (Göther, 1977, 1979; De Langen y Mulder, 1980). Algunos investigadores sin embargo llevando a cabo ensayos con nifedipino obtuvieron resultados contradictorios (Timmermans et al., 1983). Se sugirió también que la activación de los receptores presinápticos α_2 podía casionar una hiperpolarización del axón neuronal (Stjárne et al., 1978, 1979) y algunos investigadores asociaron esta hiperpolarización con un incremento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATP-asa (Vizi, 1977, 1979).

Los estudios más recientes sobre los movimientos del ion calcio cuando se estimulan receptores α_2 adrenérgicos presinápticos siguen aportando datos contradictorios. Algunos trabajos reflejan que la activación de estos receptores inhibe la liberación de neurotransmisores sin afectar la entrada de calcio por canales voltaje dependientes tipo N (Schwartz, 1997). Se sigue manteniendo sin embargo la teoría de que la estimulación α_2 adrenérgica presináptica produce una inhibición de la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes, y en concreto se piensa que inhibe su entrada a través de canales tipo N o tipo P/Q (Delmas et al., 1998; Miller, 1998). Se piensa además que el estímulo de los receptores α_2 presinápticos produce una activación y apertura de canales de K^+ (Feuvrier et al., 1998; Miller, 1998). Hoy se acepta en realidad que las respuestas producidas cuando se activan receptores α_2 adrenérgicos presinápticos son consecuencia sobre todo de la inhibición de la entrada de calcio a través de canales de calcio y de la activación de los canales de K^+ , pero recientemente se ha comprobado que el estímulo de estos receptores ocasiona también un efecto directo sobre las vesículas de almacenamiento del neurotransmisor (Miller, 1998).

Al igual que en el caso de los receptores α_1 , los movimientos del ion calcio tras el estímulo α_2 adrenérgico se entendieron mejor cuando se estudiaron los procesos bioquímicos que lo acompañaban. Ya hemos visto que la translocación del ion calcio tras el estímulo α_1 adrenérgico es consecuencia fundamentalmente del metabolismo de los PI. La translocación de calcio que ocurre tras la activación α_2 adrenérgica no parece sin embargo consecuencia de

este metabolismo (Reese y Mathews, 1986), y se asocia en la mayoría de los casos a una inhibición del enzima adenilato ciclasa. La activación de los receptores α_2 postsinápticos no neuronales localizados en las plaquetas, los islotes pancreáticos y en los adipocitos, se vio que también ocasionaba una inhibición en la acumulación de AMPc, pero este efecto ocurría independientemente de la presencia de calcio en el medio (Atlas y Sabol, 1981). La activación de los receptores α_2 presinápticos también originaba una inhibición en la actividad del enzima adenilato ciclasa, con el consiguiente descenso en los niveles intracelulares de AMPc (Faín y García-Saínz, 1980; Schultz et al., 1980; Jakobs y Schultz, 1982). Los receptores α_2 adrenérgicos son en cualquier caso receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ "sensibles a toxina *pertussis*" que a su vez inhiben la actividad del enzima adenilato ciclasa. Los estudios funcionales basados en la inhibición de las respuestas α_2 con toxina *pertussis* fueron de hecho muy útiles para llegar a la conclusión de que la inhibición del enzima adenilato ciclasa era la responsable de la transducción de la respuesta tras la activación α_2 adrenérgica (Nichols et al., 1988, 1989). Este enzima se encarga de generar AMPc a partir de adenosin trifosfato (ATP), y el AMPc es el principal mensajero implicado en la transducción de la señal cuando tiene lugar la activación α_2 (Mills, 1975; Fain y Garcia-Sainz, 1980; Boyer et al., 1983; Murayama y Ui, 1983; Schoffemeer y Mulder, 1983; Muraki et al., 1984; Cottechia et al., 1990; Chabre et al., 1994). Todos los subtipos del receptor α_2 adrenérgico utilizan principalmente este mecanismo para producir respuestas celulares cuando se activan (Murphy and Bylund, 1988; Bylund and Ray-Prenger, 1989; Fraser et al., 1989; Cottechia et al., 1990; Duzic et al., 1992; Chabre et al., 1994; Wright et al., 1995).

El enzima adenilato ciclasa comprende en realidad una familia de enzimas de estructura glicoproteica que se localizan en las membranas celulares. Se han identificado hasta ocho isoformas que se agrupan en tres subfamilias; todas ellas comparten una estructura básica similar: dos porciones, cada una de las cuales posee dos segmentos transmembrana y dos segmentos citoplásmicos que son los más conservados y menos hidrófobos en los que puede residir su actividad catalítica. El AMPc que se forma cuando actúa este enzima activa una proteína-kinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA es un tetrámero que contiene dos subunidades reguladoras (R) y otras dos catalíticas (C). Cada subunidad R contiene dos sitios de fijación para el AMPc; la unión del AMPc a las subunidades R reduce su afinidad por las C, las cuales quedan libres para expresar su actividad transferidora de radical fosfato. La distribución de las PKA es muy variable dependiendo de la naturaleza y especie celular en cuestión. Las consecuencias derivadas de las fosforilaciones subsiguientes a la activación de esta kinasa son por ello múltiples, y se manifiestan de modo muy distinto, pudiéndose observar modificación de canales iónicos, activación o desactivación de enzimas reguladoras del

metabolismo de los principios inmediatos, cambios en el estado físicoquímico de proteínas tisulares (que en cooperación con el calcio condicionan su estado de contracción o relajación), alteración en la síntesis de neurotransmisores, modificación de la expresión de genes y modificaciones en los movimientos del calcio intracelular con la consiguiente repercusión sobre otros muchos procesos celulares.

Aunque en la mayoría de los casos parece necesaria la disminución de AMPc para la respuesta tras el estímulo α_2 adrenérgico, todavía hoy día se debate si la modificación en los niveles de este mensajero es el principal mecanismo responsable de la contracción vascular por estímulo de estos receptores (Docherty, 1998b). También es posible que existan más caminos intracelulares relacionados con el estímulo α_2 . Algunos estudios en los que se evaluaba la agregación plaquetaria producida por agonistas α_2 adrenérgicos, no consiguieron de hecho demostrar que cuando se estimulaban los receptores α_2 la actividad del enzima adenilato ciclasa estuviese alterada (Haslam et al., 1975; Clare et al., 1984). Limbird y colaboradores propusieron hace tiempo que tras la activación α_2 adrenérgica se incrementaba la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en las plaquetas humanas, originándose por ello un aumento del pH intracelular y un aumento en las concentraciones de calcio (Limbird y Speck, 1983; Limbird, 1984). Ambos factores a su vez podían activar el enzima PLA_2 y este enzima promovía la síntesis de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana, aumentando por tanto los niveles de prostanoïdes agregantes como tromboxano A_2 .

Algunos estudios han reflejado que el estímulo α_2 adrenérgico no origina *per se* un descenso en los niveles de AMPc, pero cuando se produce una elevación previa de las concentraciones de este compuesto por activadores del enzima adenilato ciclasa como la forskolina, la estimulación α_2 adrenérgica puede contrarrestar dicha activación y ocasionar por tanto un descenso en los niveles de este mediador (Haynes et al., 1993; Wright et al., 1995; Haynes y Hill, 1996; Gupta et al., 1998). Existen también estudios que incluso señalan que el estímulo α_2 origina una activación del enzima adenilato ciclasa, y por tanto una elevación en los niveles de AMPc. Las proteínas acopladas al receptor α_2 en este caso se ha visto que son proteínas G_s "sensibles a toxina *colerica*" (Ullrich y Wollheim, 1984; Fraser et al., 1989; Cottechia et al., 1990; Duzic et al., 1992; Chabre et al., 1994; Jansson et al., 1995; Nasman et al., 1997). La activación del enzima adenilato ciclasa se ha observado sin embargo por regla general sólo cuando se utilizan concentraciones elevadas de agonista α_2 , y cuando además los niveles de AMPc ya han aumentado previamente por acción de algún activador del enzima adenilato ciclasa como forskolina. El hecho de que los receptores α_2 adrenérgicos puedan acoplarse a proteínas $\text{G}_{i/o}$ y G_s , produciendo efectos opuestos en uno y otro caso, hace que con

los agonistas de estos receptores se obtengan curvas bifásicas y ésto constituye un problema para establecer las afinidades de estos ligandos (Reynen et al., 2000).

Algunos investigadores han sugerido que los receptores α_2 adrenérgicos podrían estar asociados al enzima PLA₂ en algunas células, pero al menos en los vasos de resistencia no parece que sea éste el mecanismo responsable de la contracción por estímulo α_2 (Parkinson y Hughes, 1995). Los receptores α_2 adrenérgicos tampoco están acoplados en principio al enzima PLC, pero bajo determinadas condiciones la activación α_2 podría estimular este enzima además de estimular el enzima adenilato ciclasa. Tras la activación α_2 en fibroblastos de hámster que expresaban receptores α_2 adrenérgicos de riñón y plaquetas humanas, se han encontrado incrementos pequeños, pero significativos, de los niveles de IP (Cotecchia et al., 1990). Se ha propuesto que el aumento del calcio intracelular después de estimular los receptores α_2 adrenérgicos se produce en realidad por un mecanismo doble, que conlleva la apertura de canales de calcio voltaje dependientes tipo L y la liberación de calcio intracelular vía una estimulación de la PLC. Dependiendo del tipo celular donde esté expresado el receptor α_2 adrenérgico, este receptor estaría además acoplado a distintas proteínas G (Lanier, 1995; Akerman et al., 1997).

Algunos estudios apoyan que la transducción de la señal tras la activación de un receptor α adrenérgico puede regularse de forma distinta dependiendo del tejido donde se encuentre ubicado dicho receptor y puede verse afectada así mismo por la presencia conjunta de otros receptores en el mismo órgano diana encargados de controlar la misma función. Los estudios de Mo y su grupo en 1998 en la vena safena de perro, demuestran que existe una clara relación funcional entre los distintos subtipos α_1 y α_2 adrenérgicos encargados de controlar el tono vascular. Estos investigadores proponen que podría existir una interacción entre los dos tipos de receptores adrenérgicos por solapamiento de los dominios funcionales sensibles a los ligandos selectivos de cada uno de ellos, e indican que todos los subtipos de los receptores α adrenérgicos utilizarían los mismos mecanismos de transducción de la señal, liberando calcio desde los mismos depósitos intracelulares y facilitando así mismo la entrada de calcio extracelular (Mo y Kwan, 1998). Los estudios de Gesek en 1999 con ratas normotensas e hipertensas, indican también que existe una conexión molecular entre los mecanismos de transducción de la señal cuando se estimulan los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos en las células de los túbulos distales del riñón de rata durante el desarrollo de HTA (Gesek, 1999). Estudios recientes del grupo investigador de MacLennan demuestran que puede existir un cruce o conexión entre las vías intracelulares que median las respuestas α_1 y las respuestas α_2 adrenérgicas, pudiendo existir así mismo un sinergismo entre ambos

estímulos cuando se expresan estos receptores de forma heteróloga en la misma célula (Reynen et al., 2000). Esto tendría de hecho importancia en las células del músculo liso vascular, y explicaría el aumento de calcio intracelular producido por estímulo de la PLC que se observa tras la activación del receptor α_2 en las células en las que ambos receptores, los α_1 y los α_2 , pueden activarse simultáneamente. Por último cabe señalar que algunos trabajos recientes también sugieren que la vasoconstricción originada tras el estímulo α_2 adrenérgico estaría principalmente mediada por la entrada de calcio y también por la activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Florian y Watts, 1998; Roberts et al., 1998).

La **figura 4I** (página 65), refleja la transducción de la señal tras el estímulo del receptor α_2 adrenérgico postsináptico.

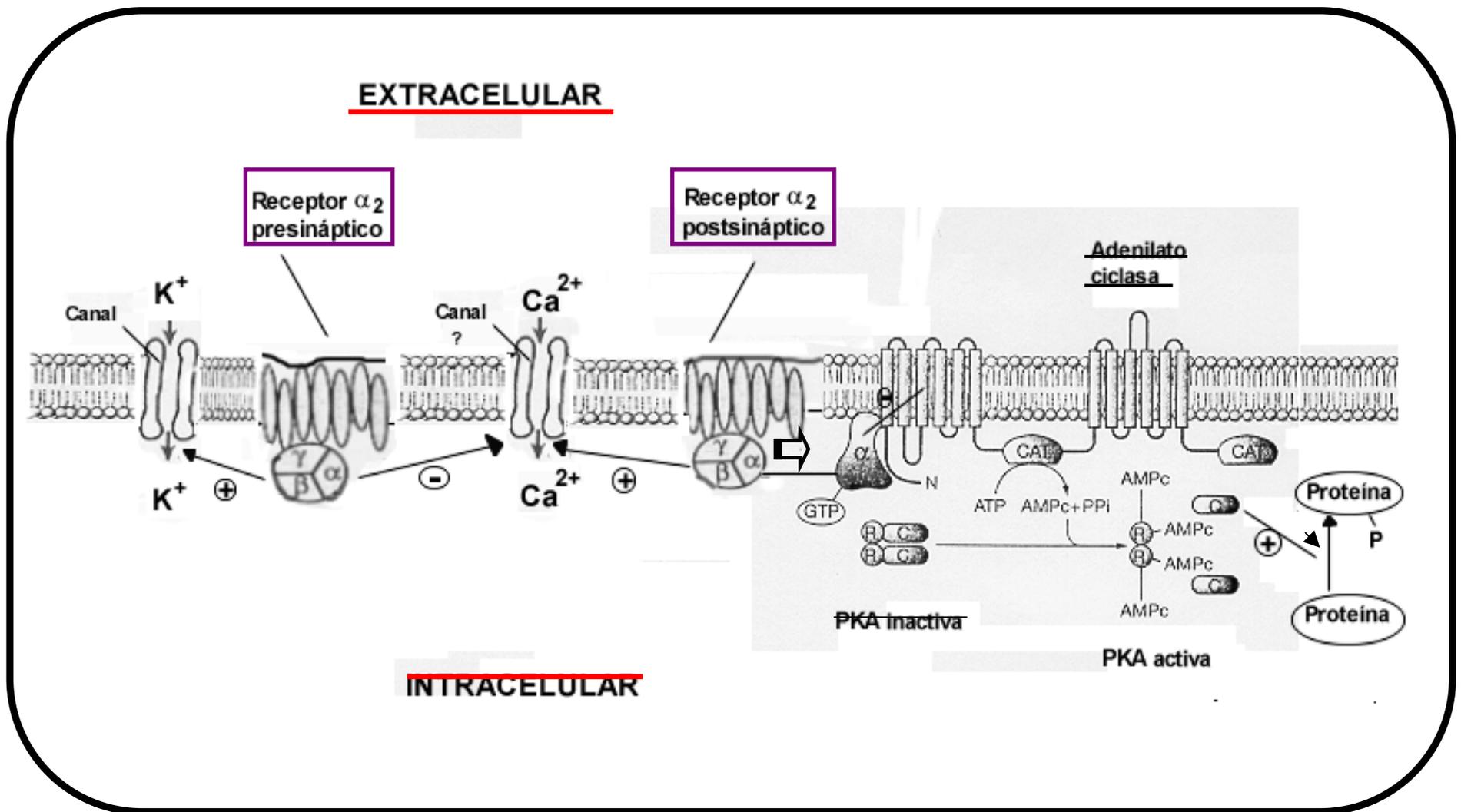


Figura 4I: Vías principales para la transducción de la señal cuando se activan receptores α_2 adrenérgicos presinápticos y cuando se activan receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos. CAT: Dominio catalítico del enzima adenilato ciclasa; PKA: Proteín Kinasa A; R: Unidad reguladora de la PKA, C: Unidad catalítica de la PKA.

Hemos dedicado esta revisión a un grupo de proteínas situadas en las membranas celulares que permiten la acción de las catecolaminas endógenas. Estas entidades, a las que también se unen específicamente algunos fármacos, se conocen como receptores α adrenérgicos. Su estudio ha permitido entender el control de múltiples funciones en el organismo, y ha permitido así mismo entender mejor el desarrollo de algunas patologías. La clasificación de los receptores α adrenérgicos en distintos tipos y subtipos, capaces de reconocer agonistas y antagonistas específicos ha permitido además diseñar fármacos útiles en terapéutica. La acción de estos compuestos de síntesis ocasiona sin embargo en muchos casos efectos no deseados, ya que dichos agentes actúan también en receptores localizados

en otros órganos distintos del órgano diana, y presentan efectos inespecíficos activando otros receptores. La función de muchos órganos está además usualmente regulada por más de un receptor adrenérgico, y no hay que olvidar que en situaciones patológicas el funcionamiento de un tejido puede depender de receptores distintos de los que controlan el funcionamiento de ese mismo tejido sano. Todo ello dificulta en muchos casos el éxito terapéutico de los fármacos. En el momento actual la utilización de ligandos marcados radioactivamente que se unen específicamente a los receptores, sigue siendo una de las técnicas útiles para la caracterización de los receptores α adrenérgicos. Se sigue además intentando el control de nuevas funciones con los ligandos de estos receptores. Las investigaciones de los últimos años sin embargo se han dedicado sobre todo al conocimiento de la estructura de los distintos tipos y subtipos de los receptores α adrenérgicos, y al conocimiento de su interacción con las proteínas G, estableciendo los mecanismos de transducción de la señal cuando los mismos se activan. Hemos reflejado también estas investigaciones en la presente revisión. Parece también importante estudiar la regulación de la expresión de los receptores durante el desarrollo, en respuesta a una serie de estímulos fisiológicos y patológicos en las distintas especies y tejidos. Es por ello posible que en un futuro sea más relevante regular los niveles de los receptores y de las proteínas G para producir efectos terapéuticos, que regular el grado de ocupación de un receptor con un agonista. En cualquier caso, todas las técnicas mencionadas en esta revisión han constituido herramientas muy útiles para el estudio de los receptores α adrenérgicos, y es posible que la combinación de las mismas pueda en un futuro abrir nuevas perspectivas terapéuticas.

1.2.- Características del amlodipino como antagonista del calcio

El amlodipino es una dihidropiridina de la segunda generación que se comporta como antagonista del calcio, y que presenta una elevada selectividad vascular. Sus efectos aparecen de forma gradual y son duraderos. Carece además de fotosensibilidad (a diferencia de otros antagonistas del calcio de tipo dihidropiridínico), y tiene una elevada potencia, una farmacocinética muy favorable, y mínimos efectos secundarios.

La calificación del amlodipino como antagonista del calcio se basa en dos hechos: su efecto inhibitorio sobre la corriente de entrada de Ca^{2+} y sobre la contracción del músculo liso y

cardíaco; y la posibilidad de revertir este efecto inhibitorio, al aumentar la concentración de Ca^{2+} .

El amlodipino es químicamente la 2-[(2-aminoetoxi)metil]-4(2-clorofenil)-3-etoxicarbonil-5-2-metoxicarbonil-6-metil-1,4-dihidropiridina (ver **figura 5I**, página 67). El enantiómero activo es la configuración (-)S de la molécula. Inicialmente se sintetizó con la idea de desarrollar un fármaco con un perfil farmacológico similar al del nifedipino, pero con mayor biodisponibilidad y duración del efecto (Burges y Dodd, 1990; Burges, 1992). Se diferencia del fármaco prototipo de las dihidropiridinas, el nifedipino, por carecer de radical nitrogenado (posiblemente por ello no presenta fotolabilidad), y por contener una cadena lateral larga en la posición 2 del anillo dihidropiridínico. Esta cadena contiene un residuo básico terminal que explica la ionización del amlodipino a pH fisiológico normal. Esto justifica así mismo su elevada solubilidad en el agua, lo cual le diferencia de otros miembros de su grupo, como el nisoldipino y el felodipino, que tienen un comportamiento neutro a pH fisiológico.

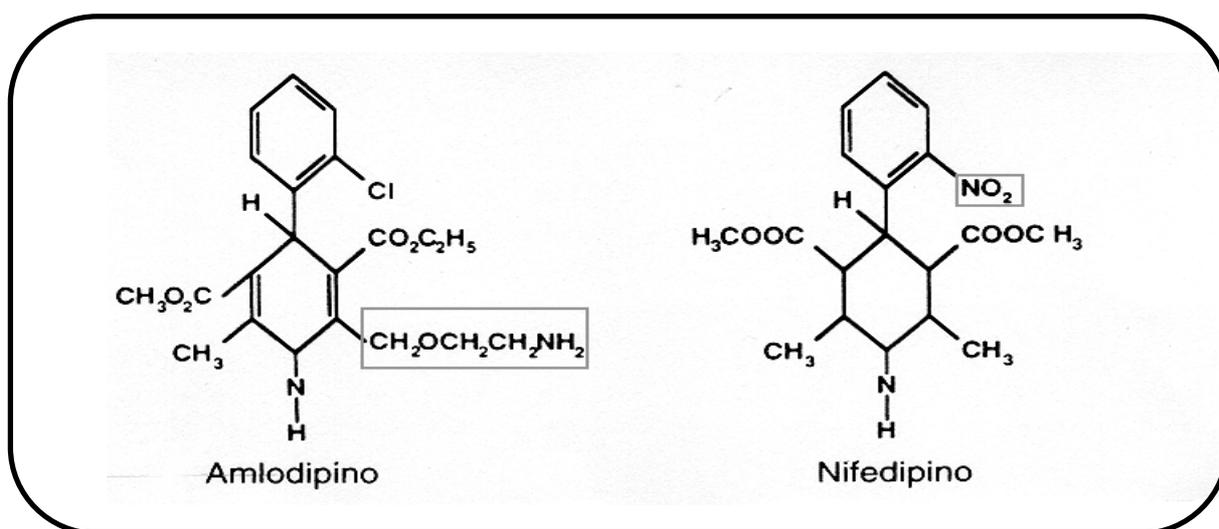


Figura 5I: Fórmulas químicas del amlodipino y del nifedipino. Se señalan las diferencias estructurales.

De acuerdo con Kass et al. (Kass et al., 1989) más del 90% de las moléculas de amlodipino se encuentran en realidad ionizadas en condiciones fisiológicas, y ésto explicaría también su interacción con el canal de Ca^{2+} tipo L. Los fármacos neutros se desplazan a través de las vías hidrófilas o hidrófobas, pero las moléculas ionizadas, como el amlodipino, muestran una capacidad restringida de penetración a través de las regiones hidrófobas de la bicapa lipídica de la membrana, y su actividad bloqueante del canal se desarrolla más lento, siendo así mismo más lenta la recuperación de sus efectos (Kass et al., 1991; Burges, 1992).

El complejo del canal de calcio tipo L es una estructura oligomérica con un peso molecular total de aproximadamente 400 kd. Contiene 5 subunidades denominadas α_1 , α_2 , β , γ y δ . Existe un consenso general que acepta que el complejo se dispone dentro del sarcolema

en la forma descrita por Caterall et al. en 1989 (Caterall et al., 1989), que se muestra esquemáticamente en la **figura 6I** (página 69). La subunidad más importante para la actividad del canal de Ca^{2+} es, sin duda alguna, la subunidad α_1 , que además forma un poro funcional. Las demás subunidades (α_2 , β , γ y δ) poseen, casi con certeza, un papel modulador. De todas las subunidades, el complejo α_1 es por lo tanto el que actúa propiamente como canal de Ca^{2+} . La subunidad α_1 se compone de 4 unidades repetidas, y cada una de ellas está formada a su vez por 6 unidades que atraviesan la membrana. El cuarto segmento de cada unidad de repetición (S4) contiene residuos con carga positiva, por consiguiente, probablemente interviene en el mecanismo sensor de voltaje (Catterall et al., 1989) (ver **figura 7I**, página 69). La subunidad α_1 completa, una vez aislada, puede actuar como canal L por sí sola (Lacerda et al., 1991), aunque de forma no regulada. Desde hace algún tiempo se sabe que los lugares de unión de alta afinidad para los antagonistas del calcio del tipo dihidropiridínico se localizan exclusivamente en la subunidad α_1 del complejo del canal de Ca^{2+} (Glossman y Striessnig, 1990). En el caso de las dihidropiridinas, la respuesta es muy curiosa y compleja, porque el "receptor" se sitúa, aparentemente, en tres regiones discontinuas de la subunidad α_1 (Striessnig et al., 1991; Nakayama et al., 1991). A estas regiones se accede desde la superficie extracelular de la membrana (Kass et al., 1991). En cambio el lugar de reconocimiento de las fenilalquilaminas (verapamilo) se sitúa dentro de la célula, y se extiende hasta la cadena carboxiterminal del complejo. Por ello, los efectos del amlodipino y de otras dihidropiridinas son independientes de la frecuencia de apertura del canal (Kass y Arena, 1989; Kass et al., 1989).

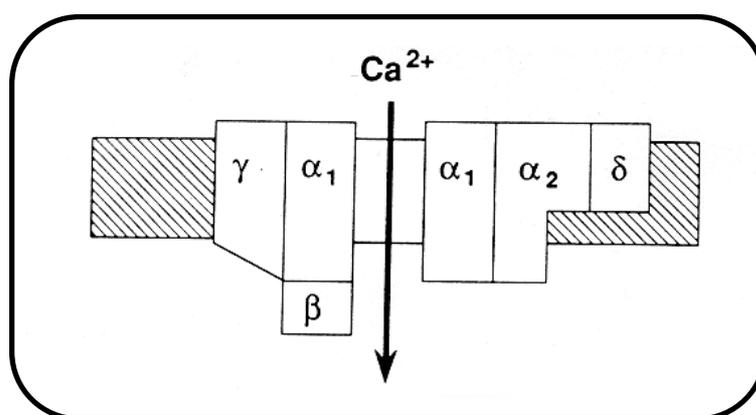


Figura 6I: Representación esquemática de la disposición de las subunidades de un canal de Ca^{2+} de tipo L. Como se puede ver, la subunidad α_1 se dispone para formar el poro central (según Catterall et al., 1989) (tomado de Nayler WG, 1994).

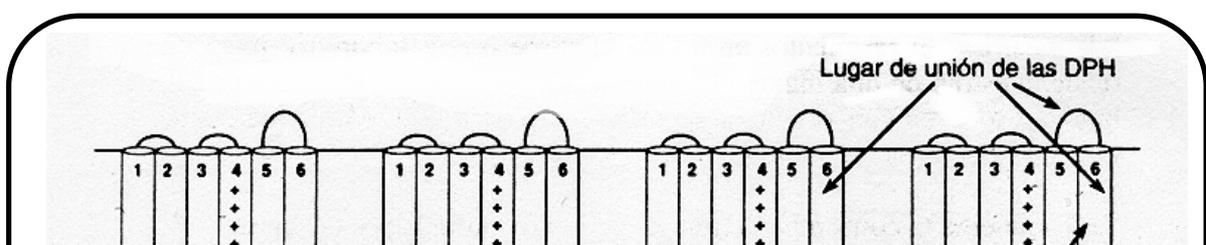


Figura 7l: Componentes estructurales de las subunidades α_1 de un canal de Ca^{2+} de tipo L (tomado de Nayler WG, 1994).

El amlodipino posee un perfil farmacocinético que le diferencia también considerablemente de otros antagonistas del calcio actuales de la segunda generación. Estas diferencias son consecuencia así mismo del perfil químico intrínseco del fármaco (Kaplan, 1991; Abernethy, 1991). Sus características cinéticas más importantes son: su elevada biodisponibilidad, su velocidad lenta de distribución tras su administración oral, su elevado volumen de distribución, y una biotransformación hepática lenta, pero marcada, que se relaciona necesariamente con la prolongada vida media de eliminación del principio activo. Los metabolitos de la molécula precursora carecen además de actividad antagonista del calcio. Todas las propiedades anteriores explican la aparición gradual de su actividad como antagonista del calcio, y explican también la prolongada duración de sus efectos, y la variabilidad interindividual relativamente baja en la respuesta (ver **figura 8l**, página 70). Todas estas propiedades condicionan también que las concentraciones plasmáticas de este fármaco no se modifiquen por otros factores (ingesta de alcohol, administración simultánea de otros fármacos...), que suelen alterar la biodisponibilidad de otros antagonistas del calcio.

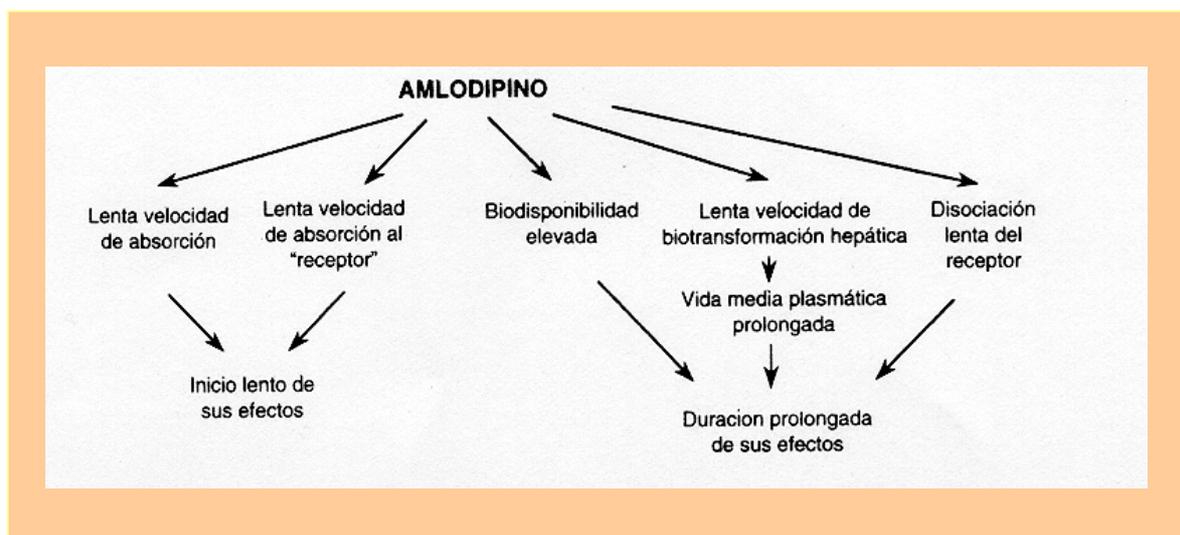


Figura 8l: Representación esquemática de los principales factores que justifican el inicio lento y el efecto mantenido de la actividad antagonista del calcio del amlodipino (tomado de Nayler WG, 1994).

Como ya hemos dicho, el amlodipino muestra elevada selectividad vascular y pocos efectos en el músculo cardíaco. Esta preferencia vascular se extiende también a la circulación coronaria. Por todo ello, es muy seguro para el tratamiento de los enfermos con alteraciones en la función ventricular. Su selectividad vascular también se pone de manifiesto cuando se utiliza como fármaco antihipertensivo. El amlodipino es en realidad, un preparado antihipertensivo eficaz que reduce la PA sistólica y la PA diastólica de los pacientes con HTA leve o moderada cuando se administra en dosis relativamente bajas (5-10 mg/día), y con una sola toma diaria. Existen numerosos estudios que confirman la capacidad del amlodipino para controlar la PA durante las 24 horas del día cuando se administra en una sola toma diaria (Julius, 1988; Kaplan, 1991; Coca et al., 1993). El efecto aparece de forma gradual y sin alteraciones significativas en los niveles de catecolaminas plasmáticas, en la actividad plasmática de la renina, ni en el lipidograma. La reducción de la presión sistémica se debe a la disminución de las resistencias vasculares periféricas, y no está relacionada en principio con cambios importantes del gasto cardíaco, ni con una deplección de volumen (Lund-Johansen et al., 1990). Además el amlodipino presenta otras características que pueden contribuir a su eficacia como fármaco antihipertensivo. Así por ejemplo, es capaz de atenuar la respuesta presora de la angiotensina II y de la NA, especialmente en los enfermos hipertensos (Donati et al., 1992), y preserva además la producción de prostaciclina inducida por los vasoconstrictores (Valloton et al., 1990).

El amlodipino es además capaz de atenuar en parte las secuelas que ocasiona la HTA (aterosclerosis, daño renal e hipertrofia cardíaca). En la **figura 9l** que aparece en esta página, se resumen las propiedades antihipertensivas del amlodipino.

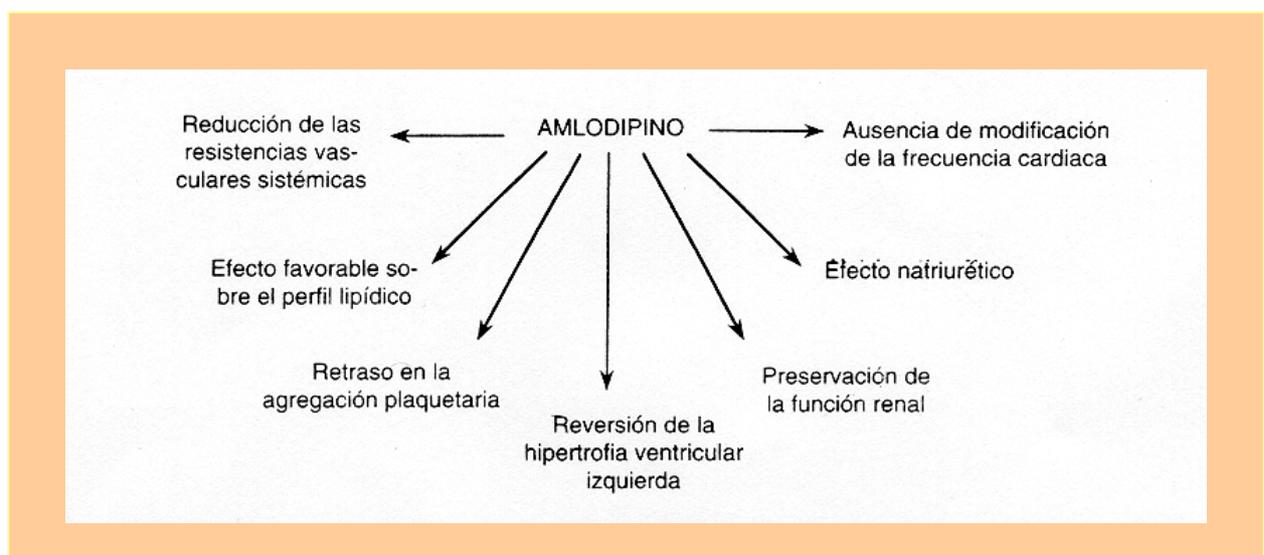


Figura 9I: Esquema de las propiedades antihipertensivas del amlodipino (tomado de Nayler WG, 1994).

La potencia como fármaco hipotensor del amlodipino es comparable a la de los α -bloqueantes selectivos, diuréticos, IECA y β -bloqueantes, pero sin embargo, la incidencia de efectos secundarios es mucho menor que la que producen estos tratamientos. El perfil de efectos secundarios del amlodipino se ha investigado ampliamente, a menudo durante períodos de más de 6 meses (Osterloh, 1991; Heynen, 1992). Presenta pocos efectos secundarios y los más frecuentes han sido edema maleolar y cefalea. Estos efectos sin embargo raramente adquieren una gravedad suficiente como para retirar la medicación. Probablemente el inicio gradual y prolongado de su efecto hipotensor condiciona también que el amlodipino presente menos efectos secundarios que los antagonistas vasoselectivos de acción más rápida.

2.- ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Antecedentes

El incremento del calcio en la dieta ocasiona paradójicamente una disminución de la PA. Este efecto se conoce hace tiempo. En la década de los 60 se comprobó ya que existía una clara correlación entre el consumo de calcio y la incidencia de HTA en mujeres gestantes (Hamlin, 1962; Chaudhuri, 1969). Algunos estudios experimentales confirmaron después el efecto beneficioso que tenían las dietas enriquecidas en calcio para controlar la PA durante la gestación (Belizan et al., 1981; Villar et al., 1987). En realidad, en las últimas dos décadas han aumentado notablemente las investigaciones de la influencia que tiene el aporte dietético de calcio sobre la PA. Se ha comprobado que las dietas enriquecidas en calcio son sobre todo capaces de controlar la PA cuando se administran durante períodos prolongados de tiempo a animales y pacientes hipertensos. Estas dietas por el contrario modifican poco la PA de los sujetos normotensos (Grobbe y Hoffman, 1986; Capuccio et al., 1987; Blakeborough et al., 1990; Jirakulsomchok et al., 1990; Orwoll y Oviat, 1990; Hano et al., 1991; Kynast-Gales y Massey, 1992; Porsti et al., 1992; Rinaldi y Bohr, 1992; Galloe et al., 1993; Bodgen et al., 1995; Passmore et al., 1997; Ezimokhai y Osman, 1998; Sacks et al., 1998; Resnick, 1999). Los estudios experimentales demostraron además que las dietas enriquecidas en calcio eran más eficaces para el control de la PA en animales jóvenes (McCarron et al., 1981; Hatton et al., 1988; Muntzel et al., 1989; Yang et al., 1989; Oparil et al., 1991), y que la PA de estos animales aumentaba cuando existía una deficiencia en el consumo de calcio (Belizan et al., 1981; McCarron et al., 1985; Lau et al., 1986; Hatton et al., 1987, 1988, 1989, 1993; Karanja et al., 1987; Geiger et al., 1988; Tenner et al., 1989; Hersmeyer et al., 1990; Pernot et al., 1990b; Scrogin et al., 1991ab; Rinaldi y Bohr, 1992; Liu et al., 1994; Rao et al., 1994; Butler et al., 1995; Karasawa et al., 1998).

Varios mecanismos pueden estar implicados en el efecto antihipertensivo del calcio. Estos mecanismos se han investigado sobre todo en estudios experimentales en los que se utilizan ratas hipertensas que se alimentan con dietas que tienen distinto contenido de calcio. Hay que tener en cuenta que las condiciones de los estudios experimentales se pueden controlar mejor que las de los estudios clínicos. En los estudios clínicos la coexistencia de varios nutrientes en la dieta, y las interacciones entre ellos, pueden siempre complicar la interpretación final de los resultados (ver revisiones Pryer et al., 1995; Allender et al., 1996; Birkett, 1998; Griffith et al., 1999).

Un modelo de HTA muy utilizado en los estudios experimentales que investigan el efecto antihipertensivo del calcio, es el de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR). El desarrollo de la HTA en esta raza presenta una gran semejanza con el desarrollo de la HTA esencial en humanos. En ambos casos la hipertensión se instaura en edades tempranas, existe un importante factor de agregación familiar, y se agrava por la ingesta de una dieta rica en sodio.

Para conseguir la raza SHR, Okamoto y Aoki en la Universidad de Kyoto hicieron cruces entre hermanos y hermanas de ratas de la raza Wistar que presentaban niveles de PA más altos de los usuales. La PA sistólica (PAS) de estas ratas usualmente estaba comprendida entre 120-130 mm Hg, pero encontraron un animal con valores muy diferentes a los del resto de la colonia, ya que su PAS oscilaba entre 145-175 mm Hg. Decidieron entonces cruzar esta rata macho con una hembra Wistar cuyos valores de PAS eran igualmente algo elevados (130-140 mm Hg). Tras varios apareamientos de esta pareja, se observó que algunos de los descendientes mostraban una HTA clara cuando alcanzaban el primer mes de edad. Estos investigadores volvieron a cruzar entre sí los animales hipertensos, y a partir de la sexta generación endogámica consiguieron animales cuya PAS aumentaba hasta alcanzar valores en muchos casos superiores a 190 mm Hg. Okamoto y Aoki comprobaron además que los valores de PAS no podían considerarse totalmente estables hasta que estos animales tenían aproximadamente 20 semanas de vida (Okamoto y Aoki, 1963). El control normotenso de las ratas SHR son lógicamente las ratas Wistar criadas en la Universidad de Kyoto. Estas ratas están ya comercializadas en todo el mundo, y hoy se conocen como ratas Wistar Kyoto (WKY). Hay no obstante que señalar que algunos investigadores definen las ratas WKY como una raza prehipertensa (Wright y Rankin, 1982). Wright y Rankin consideran en realidad que únicamente se puede aceptar que una raza de ratas es normotensa pura cuando no tiene una condición genética que la predispone a desarrollar HTA.

Algunos investigadores establecieron hace tiempo que las ratas que se alimentaban con dietas enriquecidas en calcio podían presentar paradójicamente un retraso en el desarrollo corporal (McCarron et al., 1985; Metz et al., 1988). Sin embargo, estos mismos investigadores indicaron también que este retraso no justificaba el efecto que tenían los suplementos de calcio sobre la PA. Las investigaciones clínicas usualmente también han llegado a la conclusión de que el efecto que tienen los suplementos dietéticos de calcio sobre la PA, y sobre el índice de masa corporal, son independientes (McCarron et al., 1984; Kromhout et al., 1985). Además, en los pacientes hipertensos tratados con suplementos de calcio en la dieta, no siempre se ha observado una disminución del peso corporal (McCarron y Morris, 1985; Luft et al., 1986).

Se ha comprobado que los suplementos dietéticos de calcio producen además un descenso del hematocrito en las ratas SHR, pero el efecto del calcio sobre la PA parece que es también independiente de la disminución de la viscosidad sanguínea (Hatton et al., 1991). Los efectos del calcio sobre la PA podrían sin embargo estar relacionados con su efecto natriurético. La administración de calcio produce desde luego natriuresis en los animales (Levi y Henrich, 1991). Esta eliminación de sodio se ha relacionado con el estímulo de la síntesis de prostaglandinas, y algunos investigadores la han relacionado concretamente con el estímulo de la síntesis de PGE₂ a nivel renal (Katayama et al., 1991). Mencionaremos a continuación otras

alteraciones que se han podido asociar claramente con el efecto antihipertensivo del calcio dietético.

Cuando se estudian los mecanismos implicados en el efecto del calcio sobre la PA, hay que tener en cuenta en primer lugar que las alteraciones en la ingesta de calcio producen cambios en los niveles centrales de este elemento (Harris et al., 1981; Murphy et al., 1986; Tai et al., 1986). El aumento de calcio en el SNC cuando se administran suplementos dietéticos de calcio, podría modificar los niveles de los neurotransmisores y mediadores centrales, y podría por ello ser responsable en parte de los efectos que se observan sobre la PA.

Algunos estudios han evaluado concretamente los niveles periféricos y centrales de catecolaminas cuando se modificaba el contenido de calcio en la dieta de los animales. El grupo investigador de Oparil comprobó que el incremento en la ingesta de NaCl producía en las ratas SHR una elevación de la PA, un aumento en los niveles de catecolaminas circulantes, y una disminución de los niveles de catecolaminas en el hipotálamo (Winternitz y Oparil, 1982; Oparil et al., 1988). Algunos años después, este mismo grupo observó que las dietas enriquecidas en calcio normalizaban los niveles periféricos y centrales de catecolaminas de las ratas SHR, y prevenían así mismo el aumento de la PA sodio-dependiente en estos animales (Oparil et al., 1991). También otros investigadores comprobaron que la administración de suplementos de calcio podía prevenir el aumento de la PA sodio-dependiente en ratas, normalizando la actividad simpática y corrigiendo los niveles séricos de catecolaminas (Peuler et al., 1989; Yang et al., 1989; Ando et al., 1991; Saito et al., 1991; Scrogin et al., 1991ab). Se sabe que la administración intracerebroventricular de dopamina reduce la PA de las ratas (Kondo et al., 1981), y por ello algunos investigadores propusieron también que la reducción de la PA que ocasiona la administración de calcio, estaría concretamente relacionada con el incremento central de esta catecolamina (Sutoo et al., 1987, 1988, 1989, 1991, 1993, 1995; Sutoo y Akiyama, 1997; Akiyama y Sutoo, 1999).

El aumento de la concentración de calcio que se produce en el SNC cuando se administran dietas enriquecidas en calcio, podría facilitar además la síntesis de NO en este tejido. Por estos motivos, se ha señalado que los efectos centrales de este mediador pueden ser también responsables del control de la PA que estas dietas ejercen (Cabrera y Bohr, 1995; Cabrera et al., 1996; Demontis et al., 1998).

Se han justificado así mismo los efectos del calcio sobre la PA aludiendo a las alteraciones endocrinas que su administración produce. Varios estudios experimentales sugirieron hace tiempo que el aumento de la PA que ocasionaban las dietas deficientes en calcio podía estar relacionado con la elevación en los niveles de hormona paratiroidea (PTH) (Mann et al., 1984; Togari et al.,

1989; Hagihara et al., 1990; Pernot et al., 1990; Neuser et al., 1991; Schleiffer, 1992ab). Se sabe además que los pacientes hipertensos presentan usualmente niveles bajos de calcio iónico en plasma, y en ocasiones estos pacientes tienen también niveles altos de PTH. Los suplementos de calcio podrían corregir estos parámetros en los sujetos hipertensos, y controlarían por ello su PA (Saito et al., 1989; Kishimoto et al., 1993; Levey et al., 1995; Sánchez et al., 1997; McCarty, 2000). Hay que tener en cuenta además que el hiperparatiroidismo cursa frecuentemente con niveles anormalmente elevados de PA (Hellstrom et al., 1958; Zawada et al., 1980; Lafferty et al., 1981; Grobbee et al., 1986; Hosoi et al., 1997; Schiffl et al., 1997; Ifudu et al., 1998; Rostand y Druke, 1999; McCarty, 2000). Esta hormona tiene en realidad un efecto dual. Su administración aguda produce vasodilatación (Crass et al., 1985; Dipette et al., 1992; Hosoi et al., 1997). Sin embargo, cuando se mantienen elevados los niveles de PTH, se desarrolla tolerancia a su efecto vasodilatador, y aparecen los efectos vasoconstrictores de esta hormona (Hulter et al., 1986; Kawashima et al., 1990; Kishimoto et al., 1993; Hatton et al., 1995; Oshima y Young, 1995). La administración de PTH en infusión puede ocasionar así mismo un aumento de las resistencias vasculares periféricas (Berthelot y Gairard, 1980; Hulter et al., 1986). Se ha comprobado además que la PTH es capaz de promover la entrada de calcio en distintos tipos de células (Borle, 1968; Chausmer et al., 1972; Bogin et al., 1981; Bogin et al., 1982, Fliser et al., 1997), incluidas las células del músculo liso arterial (Schleiffer et al., 1979). En cualquier caso, parece que la PTH juega un papel importante en el control del tono vascular, y que la modificación de sus concentraciones al variar el contenido dietético de calcio puede tener una repercusión importante sobre la PA.

Se ha sugerido también que los suplementos de calcio en la dieta podrían controlar la PA de los sujetos hipertensos, modificando la liberación de un factor producido por células específicas de las glándulas paratiroides distinto de la PTH (Pang et al., 1990ab; Benishin et al., 1991; Lewanczuk y Pang, 1991; Pang et al., 1991ab; Schluter et al. 1992; Lin et al. 1994; Barlet et al., 1995). Este factor tiene también naturaleza peptídica, y se aisló originalmente en el plasma de las ratas SHR (Lewanczuck et al., 1989; Benishin et al., 1991; Lewanczuck y Pang, 1991; Pang et al., 1991a; Lin et al., 1994). Se ha detectado también como factor circulante en el plasma humano (Pang et al., 1990ab; Pang et al., 1991a), y se ha aislado incluso de glándulas paratiroides humanas (Pang et al., 1990ab; Schluter et al., 1992). Se le ha denominado factor hipertensivo paratiroideo (PHF) porque produce aumento lento de la PA en ratas normotensas. Al igual que la PTH, el PHF presenta acciones calciotrópicas, que podrían justificar el aumento del tono vascular que ocasiona (Barlet et al., 1995; Pang et al., 1996).

Existen por otra parte algunos estudios clínicos (Resnick, 1987, 1990, 1991, 1994), y experimentales (DiPette et al., 1989, 1990; Roca-Cusachs et al., 1992; Kishimoto et al., 1993), que

señalan que la deficiencia de calcio ocasiona una elevación de la PA porque incrementa los niveles del metabolito activo de la vitamina D₃, calcitriol. Hay en realidad que tener en cuenta que la síntesis de calcitriol tiene lugar en el riñón por estímulo de una hidroxilasa PTH-dependiente, y el calcitriol también ha mostrado efectos calciotrópicos en tejido vascular aislado (Bukoski et al., 1987; Xue et al., 1991; Bukoski y Xue, 1993; Hatton et al., 1994; Resnick, 1994; Bian et al., 1996).

El mismo gen que expresa la hormona calcitonina es capaz de expresar otro péptido distinto de 37 aminoácidos, que se ha denominado péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Este péptido es mucho menos potente sobre el metabolismo cálcico que la calcitonina, pero está ampliamente distribuido como neurotransmisor en el SNC y periférico (Okimura et al., 1987; Hosoi et al., 1997). Aparece en altas concentraciones en las terminaciones nerviosas perivasculares, y probablemente juega un papel importante como modulador del tono vascular y del flujo sanguíneo. Algunos investigadores han comprobado que los niveles de CGRP son menores en ratas SHR que en ratas WKY (Xu et al., 1989), y se ha sugerido que el CGRP podría ser también un factor implicado en la alteración de la PA producida por las variaciones del calcio en la dieta. Las manipulaciones del calcio en la dieta provocan de hecho variaciones en los niveles de CGRP a nivel de la médula espinal. Así por ejemplo, el grupo investigador de DiPette demostró que una dieta con un contenido bajo de calcio producía una disminución de este péptido en el asta anterior de la médula, y que las dietas enriquecidas en calcio ocasionaban el efecto contrario (DiPette et al., 1988). El CGRP es desde luego un potente vasodilatador en distintas especies animales, y también en el hombre (Brain et al., 1985; Giris et al., 1985; Struthers et al., 1986; Ando et al., 1992; Gangula et al., 1997; Hosoi et al., 1997; Supowit et al., 1997). Cuando se administra en infusión produce una marcada hipotensión y una disminución de las resistencias vasculares periféricas (DiPette et al., 1987; Gardiner et al., 1989). Sin embargo, su mecanismo de acción no está todavía totalmente definido. Parece que sus efectos relajantes vasculares podrían estar mediados por distintos mensajeros intracelulares. En algunas preparaciones arteriales sus efectos se han relacionado con un incremento en los niveles de AMPc (Edwards et al., 1991; Fiscus et al., 1991; Wang et al., 1991; Gray y Marshall, 1992a; Kageyama et al., 1993). También se ha comprobado que este péptido es capaz de activar canales de potasio en las células de músculo liso arterial de conejo (Nelson et al., 1990; Quayle et al., 1994). La glibenclamida, un bloqueante de estos canales, inhibe de hecho la hipotensión que el CGRP ocasiona en estos animales (Andersson, 1992). Este péptido puede activar también la NO sintasa endotelial, y su efecto vasodilatador frecuentemente incluye un mecanismo endotelio dependiente además de un mecanismo endotelio independiente (Fiscus et al., 1991; Gray y Marshall, 1992ab; Raddino et al., 1997). Existen no obstante algunos estudios en arterias aisladas que señalan que los efectos del CGRP son totalmente independientes del endotelio, y que la relajación que produce podría deberse únicamente a su efecto directo en el músculo liso vascular (Edvinsson et al., 1985; Li y Duckles, 1992; Amerini et al., 1993; Nishimura y Suzuki, 1997; Pomerleau et al., 1997; Yoshimoto et al., 1998). La relajación vascular endotelio independiente del CGRP se ha comprobado además que es más

importante en las arterias de las ratas hipertensas que en las arterias de las ratas normotensas (Nishimura y Suzuki, 1997; Tomobe et al., 1998).

También se ha sugerido que la administración de calcio podría promover una alteración del tono vascular modificando la producción endotelial de NO (López-Jaramillo et al., 1989, 1990; López-Jaramillo y De Félix, 1991ab; Wu y Bohr, 1991; Bevan y Joyce, 1993; Passmore et al., 1997).

El aumento de la calcemia que ocasionan las dietas enriquecidas en calcio podría inducir también alteraciones en el propio músculo liso arterial. En la HTA el nivel de Ca^{2+} intracelular aumenta porque existen alteraciones en los mecanismos celulares de expulsión de este ion (Blaustein, 1977; Postnov et al., 1984; Coca y De La Sierra, 1990; Obiefuna et al., 1991; Ashida et al., 1992; Zicha et al., 1993; Timmermans et al., 1994; Orlov et al., 1995; Schiffel et al., 1996), y existen datos experimentales que indican que las dietas enriquecidas en calcio mejoran el funcionamiento de estos mecanismos de transporte iónico, pudiendo facilitar así paradójicamente su salida desde el miocito liso vascular al espacio extracelular (Fan, 1991; Fujito et al., 1991; Obiefuna et al., 1991; Porsti et al., 1992; Arvola et al., 1993b; Roullet et al., 1994; Sallinen et al., 1996; Nguyen et al., 1998).

Algunos estudios señalan que las dietas enriquecidas en calcio podrían incluso modificar la respuesta de los receptores localizados en el músculo liso vascular. Este concepto será importante para el planteamiento de esta Tesis Doctoral. Hay que tener en cuenta que los estudios que proponen que el calcio de la dieta puede controlar la PA ocasionando modificaciones de la reactividad vascular, han aportado hasta este momento datos muy contradictorios. Los estudios de reactividad vascular con arterias aisladas de ratas alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio, han aportado en realidad resultados muy dispares y difíciles de interpretar (Hatton et al., 1988; Arvola et al., 1990; Mangiarua et al., 1990; Porsti et al., 1990ab; Scrogin et al., 1991a; Porsti, 1992; Porsti et al., 1992; Mäkynen et al., 1994, 1995, 1996; Sallinen et al., 1996; Ezimokhai y Osman, 1998; Karasawa et al., 1998). Del mismo modo, los estudios de reactividad vascular en los que se han medido las respuestas presoras de los agonistas en animales alimentados con dietas de distinto contenido en calcio, han resultado muy poco concluyentes hasta este momento. En algunos de estos estudios, se comprobó que los efectos presores de los agonistas en los animales alimentados con dietas enriquecidas en calcio, eran semejantes a las elevaciones de la PA que provocaban estos agentes en los animales alimentados con dietas de contenido normal en calcio (Scrogin et al., 1991ab). En otros estudios sin embargo, se apreciaba una disminución de las respuestas presoras de los agonistas en los animales alimentados con dietas enriquecidas en calcio (Pernot et al., 1990ab; Hano et al., 1991).

En ocasiones además estas dietas producían una disminución de la PA, pero paradójicamente aumentaban la respuesta presora de los agonistas (Stern et al., 1987). Existen por último algunos estudios en los que el incremento de calcio en la dieta producía cambios en la respuesta de algunos agonistas, sin modificar la respuesta de otros (Hatton et al., 1993).

Son especialmente relevantes para el planteamiento de esta Tesis Doctoral, los estudios de reactividad vascular del grupo de Hatton en ratas SHR alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio. Este grupo de investigación en 1988 midió las respuestas contráctiles de KCl y NA en la aorta y en las arterias mesentéricas de estos animales, y no observó que estas respuestas estuviesen condicionadas por el contenido dietético de calcio (Hatton et al., 1988). Estos investigadores siguieron no obstante realizando estudios de reactividad vascular en los que medían los incrementos presores de los agonistas en animales alimentados con distintas dietas. En 1989 llevaron a cabo un estudio en el que las ratas SHR recién destetadas se alimentaban durante 7 semanas con tres dietas que tenían respectivamente un contenido bajo (Ca 0.1%), normal (Ca 1%) y alto (Ca 2%) de calcio. Quisieron en primer lugar comprobar si estas dietas podían condicionar las elevaciones de la PA que inducía el estrés producido por confinamiento en las ratas, y en segundo lugar quisieron comprobar si el efecto de las dietas podía relacionarse con modificaciones en la actividad del sistema nervioso simpático, o con modificaciones en las respuestas vasculares. Observaron que al final del período de alimentación, la PA era semejante en las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio y en las ratas SHR alimentadas la dieta que tenía un contenido normal de calcio, pero las ratas alimentadas con la dieta de bajo contenido en calcio presentaban mayores niveles de PA. Los niveles plasmáticos de catecolaminas circulantes en los animales alimentados con la dieta deficiente en calcio fueron semejantes a los de los animales que ingerían la dieta que tenía un contenido normal en calcio. La respuesta presora cuando se infundía NA estaba sin embargo condicionada por la dieta administrada, y era mayor en el grupo de animales alimentado con la dieta de bajo contenido en calcio. Por todo ello, Hatton y su grupo sugirieron que el aumento de la PA observado en los animales alimentados con la dieta deficiente en calcio podía estar relacionado con una modificación en las respuestas postsinápticas de NA (Hatton et al., 1989). En 1991 Hatton y su grupo volvieron a evaluar el efecto de dos dietas de distinto contenido en calcio, sobre la PA de ratas SHR a las que inducían también estrés por el mismo procedimiento. Las dietas tenían respectivamente un contenido bajo (Ca 0.2%) y alto (Ca 2%) de calcio. Se administraban también desde el momento del destete, y durante el mismo período de tiempo que en el estudio de 1989, pero en este caso algunos de los animales de los dos grupos establecidos recibían además suplementos de NaCl (Scrogin et al., 1991b). Las conclusiones de este trabajo fueron algo distintas de las conclusiones del estudio publicado en 1989. El consumo de NaCl aumentaba la PA de los animales, y así mismo potenciaba la elevación de la PA que producía el estrés en ellos.

Los animales en los que se había aumentado el consumo de NaCl tenían además mayores niveles de Ad circulante, y su respuesta era mayor cuando se administraba NA en infusión. Los suplementos de calcio en la dieta disminuyeron la PA de las ratas, y en esta ocasión disminuyeron también los niveles de Ad circulante, pero por el contrario, no ocasionaron modificaciones en la respuesta presora de NA. Por todo ello, estos investigadores sugirieron que los suplementos de calcio en la dieta eran en realidad capaces de normalizar los niveles de catecolaminas plasmáticas cuando estaban previamente elevados, pero su efecto sobre la PA probablemente no estaba relacionado con modificaciones en la reactividad vascular.

Las discrepancias de interpretación que parecían tener los estudios de reactividad vascular del grupo de Hatton anteriormente mencionados, condicionaron que estos investigadores llevaran a cabo nuevamente un estudio en 1993 con ratas SHR alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio. Los resultados de este estudio fueron desde luego bastante más concluyentes que los resultados de los estudios anteriores. En él los animales recién destetados se dividieron en dos grupos. Estos grupos se alimentaban respectivamente durante dos semanas con una dieta que tenía un contenido bajo de calcio (Ca 0.1%), y con una dieta que tenía un contenido alto de calcio (Ca 2.5%). Las respuestas presoras de NA fueron en este caso menores en las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, pero las respuestas presoras de angiotensina II no estaban condicionadas por la dieta utilizada, y eran por el contrario semejantes en los dos grupos de animales. Además, las diferencias entre los niveles de PA de los animales alimentados con una y otra dieta, se anulaban cuando los animales se trataban con fentolamina o prazosin, pero no desaparecían después del bloqueo de los receptores α_2 con idazoxan, y tampoco desaparecían después del bloqueo de los receptores β_1 adrenérgicos con metoprolol, o después del bloqueo de los receptores β_2 adrenérgicos con butoxamina. Por otra parte, después de provocar hipotensión administrando CGRP, captopril, o nitroprusiato sódico, seguían observándose diferencias de PA entre los animales alimentados con una y otra dieta. Por todo ello, estos investigadores concluyeron que el incremento de calcio en la dieta, era en realidad capaz de controlar la PA de los animales porque ocasionaba concretamente una disminución de sus respuestas α_1 vasoconstrictoras (Hatton et al., 1993).

Queremos mencionar también algunas de las aportaciones que nuestro de investigación ha realizado para esclarecer los principales mecanismos responsables del efecto antihipertensivo del calcio dietético. Inicialmente establecimos un modelo de HTA en ratas por privación de calcio en la dieta. Pudimos comprobar que las elevaciones de la PA que producidas por la dieta deficiente en calcio utilizada (Ca 0.1%), no eran consecuencia de las alteraciones que esta alimentación producía en el desarrollo corporal de los animales (López-Miranda et al., 1996). Estudiamos por ello la posibilidad de que otros mecanismos, tales como la disminución en los

niveles de NO, o las alteraciones en los niveles de PTH y calcitriol, pudieran justificar el aumento de la PA ocasionado por esta dieta (López-Miranda et al., 1997, 1998). Así mismo, estudiamos también la posibilidad de que el aumento en los niveles de PA que presentaban los animales alimentados con la dieta deficiente en calcio, pudiese relacionarse con alteraciones en la respuesta de sus receptores vasculares. Nuestros ensayos en aorta de ratas normotensas e hipertensas, no permitieron sin embargo correlacionar el efecto contráctil de los agonistas α_1 en este tejido, con la cantidad de calcio que ingerían los animales (Aleixandre et al., 1998). Esto no nos sorprendió, ya que sabíamos que los estudios de otros investigadores con arterias procedentes de ratas alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio, tampoco habían conseguido establecer esta relación. Por todo ello, quisimos utilizar un procedimiento más fiable que los ensayos en arterias aisladas, para evaluar las respuestas α vasoconstrictoras de los animales alimentados con la dieta deficiente en calcio. Para establecer la reactividad α vascular de estos animales medimos concretamente el efecto presor de distintos agonistas α en la preparación de "pithed rat". Justificaremos a continuación la utilidad de esta preparación para llevar a cabo estudios de reactividad vascular ya que también la utilizaremos en la presente Tesis Doctoral.

La preparación de "pithed rat" es un modelo experimental, descrito por primera vez en 1947, en el que se destruye el SNC de los animales (Shiple y Tilden, 1947). Lógicamente en estas condiciones las respuestas presoras de los fármacos reflejan únicamente sus efectos periféricos. Esta preparación permite por lo tanto una evaluación de la reactividad vascular *in vivo*. De hecho, distintos investigadores comprobaron ya en 1980, que la preparación de "pithed rat" podía utilizarse para medir las respuestas vasoconstrictoras mediadas por estímulo de los receptores α_1 y α_2 vasculares (Docherty y McGrath, 1980ab; Timmermans y Van Zwieten, 1980; Timmermans et al., 1980). Desde entonces muchos investigadores, y también nuestro grupo de investigación, la han utilizado con esta finalidad (DeJonge et al., 1982; Ruffolo et al., 1984; Richer et al., 1987; Timmermans et al., 1987; Simavorian et al., 1990; Motley et al., 1992; Schwietert et al., 1992; Triggle y Tabrizchi, 1992, Tabrizchi y Triggle 1994; Puerro y Aleixandre, 1993, 1994; Aleixandre et al., 1995; Gavin y Docherty, 1996; Civantos et al., 1999; Feng et al., 1999). Cabe especialmente resaltar que la preparación de "pithed rat" resulta muy útil para evaluar las respuestas α_2 vasoconstrictoras. Sabemos que la contracción del músculo liso arterial cuando se administra un agonista α , no es sólo consecuencia del estímulo de los receptores α_1 postsinápticos localizados en él. Esta contracción es también consecuencia del estímulo de los receptores α_2 , que al igual que los α_1 , están allí localizados. De hecho, el estímulo de los receptores α_2 postsinápticos localizados en el músculo liso vascular, colabora al mantenimiento del tono arterial que ocasionan las catecolaminas circulantes. Sin embargo, cuando se

administran agonistas α_2 *in vivo*, el efecto de estos compuestos sobre los receptores α_2 centrales produce una caída de la PA, no pudiendo apreciarse la respuesta vasoconstrictora mediada por estímulo de los receptores α_2 periféricos. Es obvio que cuando se administran agonistas α_2 en la preparación de “pithed rat” no puede producirse este descenso de la PA. El efecto presor que por el contrario producen en ella estos fármacos refleja la contracción vascular que ocasiona el estímulo de los receptores α_2 periféricos. Esta preparación presenta además claras ventajas sobre los estudios *in vitro* para evaluar respuestas α_2 vasoconstrictoras, porque hay que tener en cuenta que la contracción que ocasionan los agonistas α en los estudios *in vitro* está usualmente mediada por el estímulo de los receptores α_1 postsinápticos (Docherty y Starke, 1981; Van Breeemen et al., 1982; Oriowo et al., 1987). En la mayoría de las arterias aisladas sólo es posible producir respuestas contráctiles mediadas por receptores α_2 postsinápticos cuando se administran concentraciones muy altas de agonistas α_2 muy selectivos. Muchas veces, para que aparezcan estas respuestas, se requiere además una activación de la entrada de calcio al interior de las células del músculo liso vascular, (Itoh et al., 1987; Xiao et al., 1987; Lues y Schüman, 1984; Bou y Massingham, 1986). Nuestro grupo de investigación demostró concretamente en 1992, que los agonistas α_2 selectivos B-HT 920 y B-HT 933, únicamente producían contracciones α_2 en la aorta de conejo cuando se trabajaba en presencia del agonista del calcio BAY K 8644 (Aleixandre et al., 1992). Queda por lo tanto establecida la utilidad de la preparación de “pithed rat” para los estudios en los que se quiere evaluar la respuesta de los receptores vasculares.

Los ensayos que nuestro grupo de investigación llevó a cabo con agonistas α en la preparación de “pithed rat” cuando estudiábamos el efecto de la dieta deficiente en calcio, formaron parte de una Tesis Doctoral ya defendida. Los resultados de aquellos ensayos se han publicado en conjunto con los resultados obtenidos en la presente Tesis (Civantos et al., 1999). Pudimos comprobar que la dieta deficiente en calcio no alteraba las respuestas α vasoconstrictoras de las ratas normotensas e hipertensas. Los procesos que se modifican cuando aumenta la PA al disminuir la ingesta de calcio, no tienen porqué ser sin embargo los mismos, que los procesos que se modifican cuando disminuye la PA al incrementar el aporte dietético de calcio. Cabe por ello pensar que las dietas enriquecidas en calcio puedan, a pesar de todo, promover una disminución de las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares, y que como consecuencia de ello controlen la PA cuando ésta está elevada. Esta es en realidad una idea clave para el planteamiento de esta Tesis Doctoral. Ya hemos mencionado los estudios de reactividad vascular de otros investigadores en animales que ingieren dietas de distinto contenido en calcio. Los más consistentes hasta el momento creemos que son los del grupo de Hatton, pero de todos modos, en aquellos estudios a nuestro juicio el período de alimentación de las ratas era relativamente corto, y además la reactividad α vascular se medía de forma indirecta, y sólo al

finalizar este período. En esta Tesis Doctoral se hará un seguimiento prolongado de los cambios que van apareciendo en la PA, y en las respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras de las ratas cuando se utilizan suplementos dietéticos de calcio. Además en ella las respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras de los animales se evaluarán utilizando la preparación de "pithed rat".

Para el planteamiento de esta Tesis Doctoral, serán también importantes algunos estudios que sugieren que las dietas enriquecidas en calcio pueden mejorar la eficacia de algunos tratamientos farmacológicos utilizados tradicionalmente para el control de la HTA, como son los antagonistas del calcio. Los antagonistas del calcio, se ha visto que resultan en realidad eficaces en los mismos pacientes que responden de forma favorable al incremento del calcio dietético (Resnick y Laragh, 1985). Por otra parte, a nivel experimental se ha demostrado que estos fármacos bloquean mejor los canales de calcio en las células de las ratas alimentadas con dieta enriquecida en calcio (Hermsmeyer et al., 1990). En esta línea de investigación son especialmente relevantes las aportaciones experimentales del grupo de Pang. Estos investigadores alimentaban a las ratas SHR con tres dietas de distinto contenido en calcio (0.2%, 0.4% y 0.8%). Esta pauta de alimentación comenzaba cuando los animales tenían 12 semanas de vida, y los animales alimentados con cada dieta se dividían a su vez en cuatro grupos, de los cuales tres se trataban respectivamente con 3, 9 y 18 mg/kg/día de nifedipino, y el cuarto grupo no recibía tratamiento farmacológico. Estos investigadores realizaron también ensayos semejantes con verapamilo, y las dosis que utilizaban de este fármaco fueron 18, 54 y 108 mg/kg/día. Midieron la PA de los animales cuando tenían 20 semanas de vida (final del período de alimentación y/o tratamiento) canulando la arteria carótida, y comprobaron que la administración de los antagonistas del calcio únicamente producía una disminución de la PA cuando la dieta tenía un contenido mínimo de calcio, siendo además mayor la disminución de la PA que ocasionaban estos fármacos cuando la cantidad de calcio ingerida aumentaba (Pang et al., 1992).

Existen además algunos trabajos experimentales, en los que se ha intentado revertir el aumento de la PA que causa la deficiencia de calcio en la dieta, con antagonistas del calcio. En estos trabajos, el efecto de los antagonistas del calcio se ha comparado con el de otros compuestos antihipertensivos, como son los antagonistas del sistema renina angiotensina. Así por ejemplo, Togari et al. en 1988 (Togari et al., 1988), comprobaron que la elevación de la PA provocada en ratas Wistar por una dieta deficiente en calcio, se revertía con la administración aguda de nifedipino, pero no se revertía con la administración aguda de captopril. Los estudios de Tordoff et al. en 1993 (Tordoff et al., 1993) son también importantes. En ellos se pudo comprobar que la privación de calcio no alteraba las concentraciones plasmáticas de aldosterona en ratas, y tampoco alteraba la actividad de la renina plasmática en estos animales. Estos autores

comprobaron además que el antagonista de los receptores AT₁ de angiotensina Losartán, tampoco era capaz de revertir el incremento en el consumo de NaCl inducido en estos animales por una dieta deficiente en calcio. Los antagonistas del calcio parecían por lo tanto capaces de revertir la HTA producida por la deprivación dietética de calcio, pero la eficacia de los antagonistas del sistema renina angiotensina para revertir esta HTA resultaba más dudosa. Más recientemente sin embargo, se ha señalado que el sistema renina angiotensina podría estar implicado en el aumento de la PA que ocasiona la dieta de contenido bajo en calcio (Sumikura et al., 1994; Yuasa et al., 1996). Yuasa et al. en 1996 (Yuasa et al., 1996) observaron concretamente que el captopril era capaz de atenuar el desarrollo de HTA, y la pérdida de las respuestas natriuréticas, que ocasionaba una dieta deficiente en calcio en ratas Sprague-Dawley (SDR).

A pesar de todos los trabajos mencionados, hasta este momento no existen estudios que hayan evaluado la PA de sujetos hipertensos tratados simultáneamente con suplementos dietéticos de calcio y antagonistas del calcio. La utilización conjunta de ambas medidas podría resultar ventajosa para el control de la HTA, pero el mecanismo que justificaría este sinergismo tampoco se ha investigado hasta este momento. Hay que tener no obstante en cuenta que ambas medidas podrían conducir a una disminución de los niveles intracelulares de calcio, y estos niveles condicionan en último término el tono vascular. De hecho, los antagonistas del calcio inhiben la entrada de calcio al interior de las células del músculo liso arterial, y hemos dicho en este apartado que los suplementos de calcio podrían mejorar su extrusión celular. En los sujetos hipertensos los suplementos de calcio corrigen además los niveles anormalmente altos de hormonas y factores vasoconstrictores, que son capaces de facilitar la entrada de calcio al miocito liso vascular. Los suplementos de calcio y los antagonistas de calcio, podrían por lo tanto favorecer la existencia de niveles intracelulares bajos de calcio, y podrían por ello ocasionar también una disminución de las respuestas α vasoconstrictoras. Su administración conjunta podría en realidad hacer que las respuestas α vasoconstrictoras fuesen especialmente pobres. En esta Tesis Doctoral también se estudiará esta posibilidad. Distintos investigadores (Van Meel et al., 1981, Kalkman et al., 1982; Timmermans et al., 1983; Ruffolo et al., 1984; Timmermans et al., 1987; Tabrizchi y Triggle, 1994), y también nuestro grupo de investigación (Aleixandre et al., 1995), comprobaron hace tiempo que la administración aguda de los antagonistas del calcio ocasionaba una disminución de las respuestas de los agonistas α en la preparación de "pithed rat". Estos fármacos producían sobre todo una disminución de las respuestas presoras de los agonistas α_2 . Esto no es extraño porque la respuesta α_2 vasoconstrictora depende en mayor medida de la entrada de calcio extracelular que la respuesta α_1 vasoconstrictora. No hemos encontrado sin embargo referencias de trabajos que hayan evaluado las respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras después de la administración crónica de antagonistas del calcio. Más aún, no existe hasta este

momento ningún estudio en el que se haya evaluado la PA y las respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras de animales que reciban un tratamiento crónico conjunto con suplementos de calcio en la dieta y antagonistas del calcio.

Teniendo en cuenta todas las anteriores consideraciones, y como continuación de la línea de investigación iniciada por nuestro grupo hace algunos años para estudiar la relación entre el calcio dietético y la PA, nos planteamos en esta Tesis Doctoral la hipótesis y los objetivos que figuran a continuación.

2.2.- Hipótesis

Las dietas enriquecidas en calcio son capaces de disminuir la PA de los sujetos hipertensos porque ocasionan una disminución de sus respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras, y los antagonistas del calcio favorecen el efecto antihipertensivo de los suplementos dietéticos de calcio porque cuando se administran conjuntamente con ellos, la disminución de las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares es todavía mayor.

2.3.- Objetivos

Los objetivos prioritarios de la presente Tesis Doctoral serán:

1º) Medir semanalmente la PA de ratas normotensas SDR y de ratas hipertensas SHR que se alimentan con una dieta enriquecida en calcio durante un período prolongado de tiempo, y medir así mismo semanalmente la PA de los animales de estas mismas razas que se alimentan con una dieta de contenido normal en calcio durante este mismo período de tiempo.

2º) Evaluar las repuestas presoras de agonistas selectivos α_1 y α_2 , y las repuestas presoras de angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", utilizando para ello ratas SDR y ratas SHR alimentadas con las dos dietas mencionadas. Estas evaluaciones se llevarán a cabo en los momentos de la vida de las ratas en los que aparezcan cambios relevantes de la PA que puedan relacionarse con la ingesta de calcio.

3º) Medir semanalmente la PA de ratas SHR tratadas con amlodipino durante un período prolongado de tiempo, y medir así mismo semanalmente la PA de los animales de esta raza que además de tratarse con amlodipino se alimentan con una dieta enriquecida en calcio.

4º) Evaluar las respuestas presoras de los agonistas α_1 y α_2 selectivos en la preparación de “pithed rat”, utilizando para ello ratas SHR alimentadas con las dos dietas mencionadas que alternativamente se habrán tratado con amlodipino, o no habrán recibido tratamiento farmacológico. Estas evaluaciones se llevarán a cabo en los momentos en los que la administración conjunta del antagonista del calcio y los suplementos dietéticos de calcio ocasionen cambios relevantes de la PA.

Otros objetivos complementarios en esta Tesis Doctoral serán:

5º) Controlar el desarrollo y la ingesta en todos los grupos de ratas.

6º) Determinar la calcemia de los animales de los distintos grupos en los momentos en los que se evalúe su reactividad vascular.

3.-MATERIAL Y METODOS

En esta Tesis se llevaron a cabo dos estudios consecutivos. En el primero (Estudio nº 1) se investigó el efecto de una dieta enriquecida en calcio sobre la PA y la reactividad vascular de ratas normotensas e hipertensas. Este estudio permitió cumplir básicamente los objetivos 1 y 2 de la Tesis. En el segundo estudio (Estudio nº 2) se investigó el efecto que tenía la administración conjunta de esta dieta enriquecida en calcio con un antagonista del calcio sobre la PA y la reactividad α vascular en ratas hipertensas. Este segundo estudio permitió cumplir los objetivos 3 y 4 de esta Tesis Doctoral. Las determinaciones que se llevaron a cabo para cumplir los objetivos 5 y 6 son un complemento de estos dos estudios. Figuran a continuación los protocolos experimentales concretos, las características y la composición de las dietas administradas a los animales y la descripción de las técnicas utilizadas en ellos.

3.1.- Protocolos experimentales

3.1.1.- Protocolo del Estudio nº 1

Para este estudio se utilizaron ratas macho SDR normotensas, y ratas macho hipertensas de la raza SHR. Los animales de ambas razas se destetaron de sus madres a las 3 semanas de vida, y a partir de ese momento se trasladaron a jaulas de mantenimiento alojando 5 animales en cada una. Todas estas ratas se mantenían con una temperatura ambiental estable de 23° C y con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y comida a libre disposición. Un grupo de animales de cada raza se alimentó con una dieta semisintética de caseína que tenía un contenido normal de calcio (Ca 1%). A esta dieta la llamaremos dieta control, y nos referiremos al grupo de animales alimentado con ella como grupo control. Otro grupo de animales de cada raza se alimentó con una dieta semisintética de caseína semejante a la anterior pero que tenía un contenido alto de calcio (Ca 2.5%). A esta última dieta la llamaremos dieta enriquecida en calcio. En lo que respecta a los demás nutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales) la dieta enriquecida en calcio era igual a la dieta control, y la composición concreta de estas dietas figura en el **apartado 3.2** (página 96).

El período de alimentación con estas dos dietas fue distinto para los animales de ambas razas, ya que su desarrollo y maduración sexual es diferente. Las ratas SDR se alimentaron con las dietas señaladas desde el destete hasta las 9 semanas de vida porque en este momento se considera que los animales de esta raza alcanzan su madurez sexual (Poole, 1987). Las ratas SHR se alimentaron sin embargo con estas dietas desde el destete hasta las 20 semanas de vida, ya que en este caso los animales completan su desarrollo más tarde y sólo presentan con seguridad valores máximos estables de PA cuando alcanzan esta edad (Okamoto y Aoki, 1963; Smith y Hutchins, 1979; Karr-Dullien et al., 1981; López-Miranda et al., 1996, 1998; Civantos et

al., 1999).

Durante el período de alimentación reseñado los animales bebían siempre agua corriente de Madrid que tiene un contenido de calcio de 1 mg/100 ml. El contenido de calcio de este agua se obtuvo mediante un análisis efectuado por el Laboratorio de la Base Aérea de Getafe.

Para estudiar las posibles alteraciones en el desarrollo de los animales tratados con suplementos dietéticos de calcio, se pesó semanalmente a las ratas de los dos grupos establecidos en cada raza (grupo control y grupo alimentado con la dieta enriquecida en calcio), durante el período de alimentación reseñado. Al finalizar este período se midió además la longitud de la cola de las ratas, que es un indicador válido de su grado de maduración y desarrollo esquelético alcanzado (Metz et al., 1988). Así mismo, se estimó el consumo medio de los animales de las dos razas alimentados con cada dieta al finalizar el período de alimentación. Para ello en dos jaulas se medía semanalmente el consumo global de los 5 animales que las ocupaban, y finalizado el período de alimentación se obtenía el consumo total realizado por los animales de cada jaula como suma de estas medidas, estimándose a partir de estos valores la ingesta media en gramos de un animal durante un día. También se controló semanalmente la ingesta líquida de los animales para poder ajustar así posteriormente las soluciones farmacológicas que se administrarían en el estudio nº 2.

Desde las 6 semanas de vida hasta finalizar el período de alimentación reseñado se obtuvieron semanalmente medidas de la PAS y de la PAD de las ratas de los dos grupos establecidos en cada raza (grupo control y grupo alimentado con dieta enriquecida en calcio). Para ello se utilizó el método del manguito en la cola ("tail-cuff") (Buñag, 1973) que permite obtener una medida indirecta de la PA en animal consciente. Este método se describe más adelante en el **apartado 3.3** (página 97).

Medimos la calcemia, evaluamos también la reactividad α vascular y la reactividad vascular a angiotensina II, de las ratas SDR y SHR alimentadas con las dos dietas en los momentos de la vida en los que aparecían cambios relevantes de la PA que podían relacionarse con la ingesta de calcio. Las medidas de la PA en los animales nos llevaron concretamente a realizar estas determinaciones en las ratas SDR y SHR de este estudio al finalizar el período de alimentación reseñado, y también a realizarlas en las ratas SHR de este estudio que tenían 15 semanas de vida. El método utilizado para determinar la calcemia se describe más adelante en el **apartado 3.5** (página 101). Para evaluar la reactividad α vascular y la reactividad vascular a angiotensina II de los animales, se llevaron a cabo ensayos con agonistas selectivos de receptores α_1 y α_2 , y con angiotensina II, en la preparación de "pithed rat" Esta preparación y estos ensayos se describen en

el apartado 3.4 (página 98).

La **Figura 1M** (página 92), representa un esquema del protocolo experimental de este estudio.

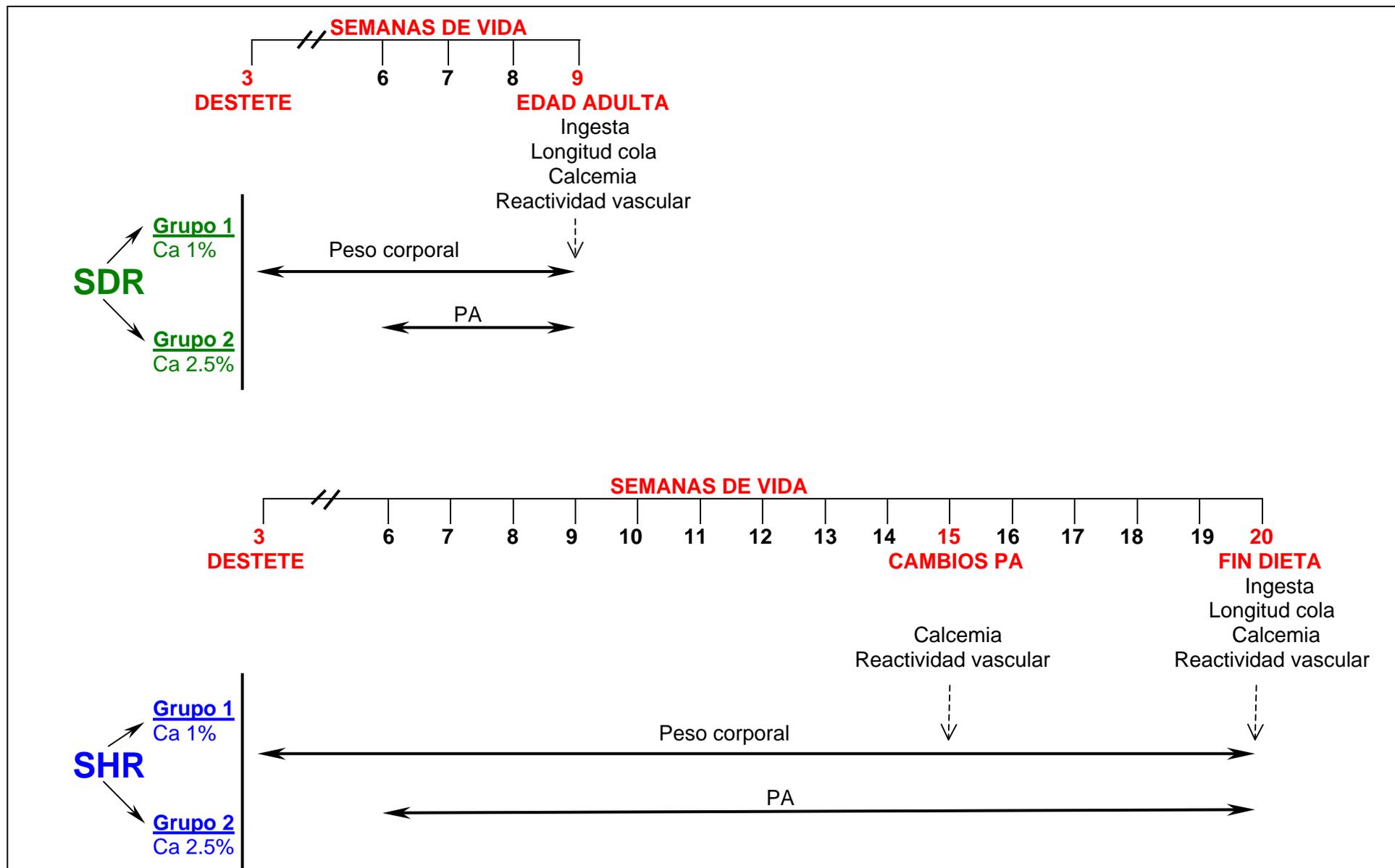


Figura 1M: Esquema del protocolo experimental del estudio nº 1. SDR: ratas Sprague-Dawley, SHR: ratas espontáneamente hipertensas, PA: presión arterial.

3.1.2.- Protocolo del Estudio 2º

Para este estudio se utilizaron ratas macho SHR, que se destetaron de sus madres a las 3 semanas de vida, y a partir de ese momento se trasladaron a jaulas de mantenimiento alojando

5 animales en cada una. Todas estas ratas se mantenían con una temperatura ambiental estable de 23° C y con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y comida a libre disposición. Los animales se dividieron en cuatro grupos. Dos de ellos se alimentaron con la dieta control de contenido normal en calcio (Ca 1%), y los otros dos se alimentaron con la dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%). A uno de los dos grupos alimentados con cada dieta se le administraba además 1 mg/kg/día de amlodipino. Este fármaco se administraba con el agua de bebida, y para asegurar la dosificación señalada se modificaba la solución semanalmente en función de la variación del peso corporal y la ingesta líquida de los animales. Se consideró grupo control el grupo de animales alimentados con la dieta Ca 1% de contenido normal en calcio que no recibía tratamiento farmacológico.

Para asegurar una caracterización completa y adecuada de las modificaciones de la PA que podían aparecer cuando se administraban conjuntamente suplementos de calcio en la dieta y antagonistas del calcio durante períodos prolongados de tiempo creímos oportuno prolongar el período de alimentación y/o tratamiento farmacológico en este estudio hasta que los animales tenían 25 semanas de vida.

Al igual que en el estudio nº 1 el agua de bebida de los animales fue siempre agua de uso corriente de Madrid con un contenido de calcio de 1 mg/100 ml.

Para estudiar las posibles alteraciones en el desarrollo de los animales tratados con suplementos dietéticos de calcio y/o el antagonista del calcio, también en este estudio llevamos a cabo medidas semanales del peso corporal de las ratas de todos los grupos durante el período de alimentación y/o tratamiento farmacológico. Del mismo modo al finalizar este período se midió también la longitud de la cola de estas ratas, y se estimó el consumo medio de los animales de todos los grupos. Esta estimación se llevó a cabo por el mismo procedimiento descrito en el estudio nº 1.

Desde las 6 semanas de vida y hasta finalizar el período de alimentación y/o tratamiento farmacológico se obtuvieron semanalmente medidas de la PAS y de la PAD de las ratas SHR de los cuatro grupos (grupo control, grupo alimentado con dieta enriquecida en calcio, grupo alimentado con dieta de contenido normal en calcio tratado con amlodipino y grupo alimentado con dieta enriquecida en calcio tratado con amlodipino). Para ello al igual que en el estudio nº 1 se utilizó el método del "tail-cuff" (Buñag, 1973) que permite la medida indirecta de la PA en animal consciente. La medida de la PA mediante este método en animales hipertensos presenta sin embargo bastantes dificultades, y por ello en este estudio las medidas de la PAS y de la PAD con el "tail cuff" se llevaron a cabo anestesiando superficialmente a los animales con éter dietílico

según el procedimiento descrito por Dietz et al., en 1978 (Dietz et al., 1978) que se describe en el **apartado 3.3** (páginas 95 y 96). El aparato utilizado para obtener medidas registra también la frecuencia cardíaca de los animales y hay que señalar que a la vista de los resultados obtenidos en el estudio nº 1, en este estudio también se consideró oportuno obtener medidas de la frecuencia cardíaca de los animales en los mismos momentos en los que se medía su PAS y su PAD.

Medimos la calcemia y evaluamos también la reactividad α vascular de las ratas SHR de los cuatro grupos, en los momentos en los que la administración conjunta del antagonista del calcio y los suplementos dietéticos de calcio ocasionó cambios relevantes de la PA. Las medidas de la PA en los animales nos llevaron concretamente a realizar estas determinaciones en las ratas SHR de este estudio que tenían 16 y 23 semanas de vida. Para determinar la calcemia se siguió el mismo método utilizado en el estudio nº 1 que se describe en el **apartado 3.5** (páginas 101 y 102). Para evaluar la reactividad α vascular de los animales se llevaron a cabo ensayos con agonistas selectivos de receptores α_1 y α_2 en la preparación de "pithed rat" semejantes a los del estudio nº 1 que se describen en el **apartado 3.4** (páginas 98-101).

La **Figura 2M** (página 95), representa un esquema del protocolo experimental de este estudio.

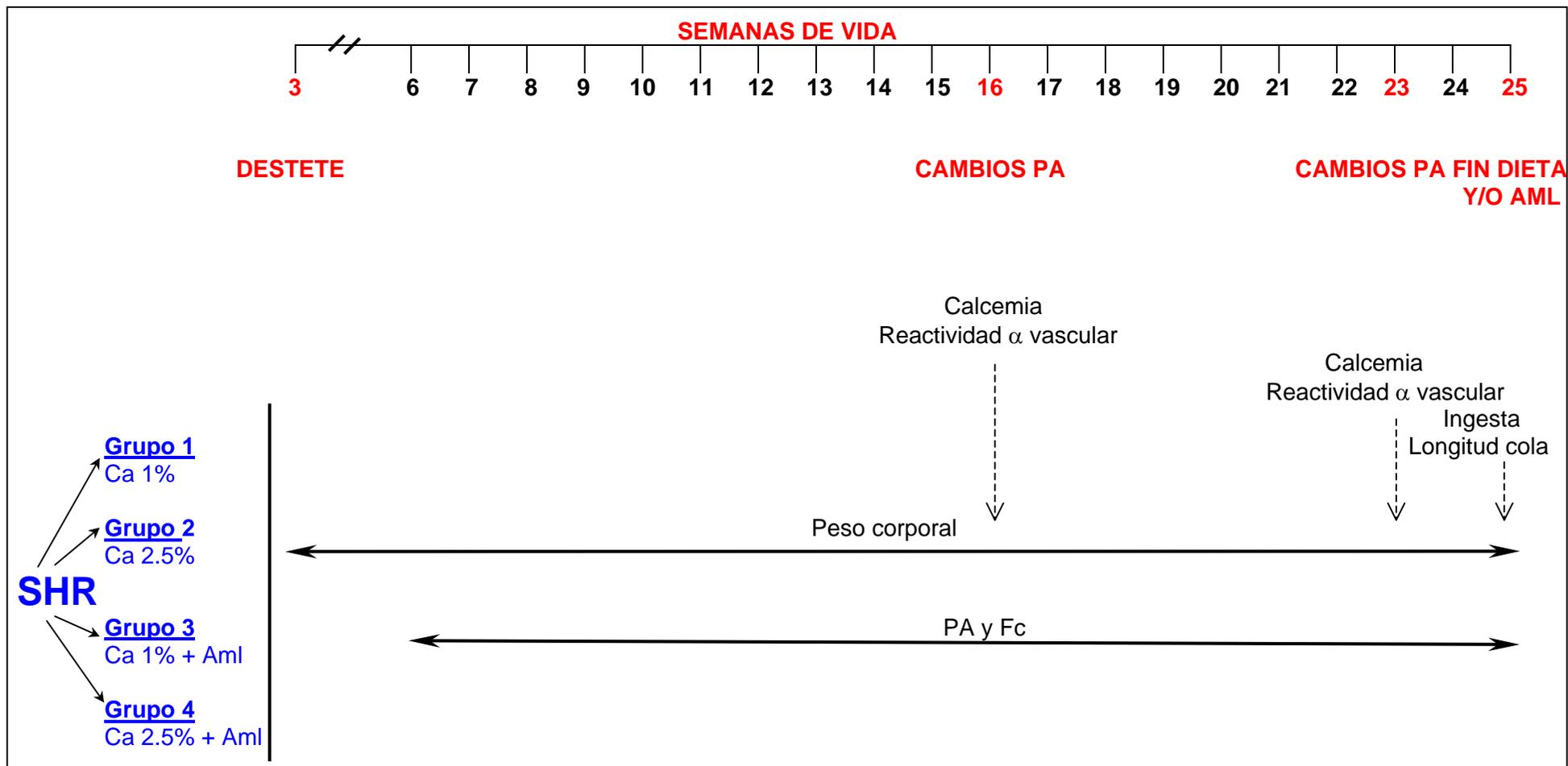


Figura 2M: Esquema del protocolo experimental del estudio nº 2. SHR: ratas espontáneamente hipertensas, Aml: amlodipinio (1 mg/kg/día), PA: presión arterial, Fc: frecuencia cardíaca.

3.2.- Composición y características de las dietas

PRESENTACION: Gránulos de 10 cm de diámetro

Características:

Humedad.....12.0%
Proteínas.....19.0%
Lípidos..... .5.3%

Composición general:

Caseína.....23%
Glucosa y almidón.....58%
Grasa vegetal.....5%

Extracto no nitrogenado.....	52.3%	Celulosa.....	6%
Contenido celulósico.....	5.4%	Compuestos minerales.....	7%
Minerales.....	6.0%	Complejo vitamínico.....	1%

Aminoácidos:

Arginina.....	8500 mg/kg
Cisteína.....	3000 mg/kg
Lisina.....	17000 mg/kg
Metionina.....	7100 mg/kg
Triptófano.....	5000 mg/kg
Glicina.....	1000 mg/kg

Contenido mineral:

Fósforo.....	7750 mg/kg
Calcio.....	10000 mg/kg*
Potasio.....	6000 mg/kg
Sodio.....	4000 mg/kg
Magnesio.....	1000 mg/kg
Hierro.....	300 mg/kg
Cobre.....	12.5 mg/kg
Zinc.....	45 mg/kg
Cobalto.....	0.09 mg/kg
Iodo.....	0.49 mg/kg

Contenido en vitaminas:

Vitamina A.....	19800 UI/kg
Vitamina D.....	2500 UI/kg
Vitamina B ₁	20 mg/kg
Vitamina B ₂	15 mg/kg
Vitamina B ₆	10 mg/kg
Vitamina B ₃	70 mg/kg
Vitamina B ₇	150 mg/kg
Vitamina B ₁₂	0.05 mg/kg
Vitamina E.....	170 mg/kg
Vitamina K.....	40 mg/kg
PP.....	100 mg/kg
Colina.....	1360 mg/kg
Acido fólico.....	5 mg/kg
PABA.....	50 mg/kg
Biotina.....	0.3 mg/kg

*: El contenido en la dieta enriquecida en calcio era 25000 mg/Kg.

PP: Acido pantoténico; PABA: Acido paraminobenzoico.

3.3.- Medidas de presión arterial-Método del manguito en la cola

Para las medidas de la PA se utilizó un equipo de "tail cuff. Los equipos que se utilizan para medir por este método la PA usualmente permiten conseguir medidas fiables de la PAS, que refleja en menor grado que la PAD el valor de las resistencias periféricas. Sin embargo el equipo que se utilizó en esta Tesis Doctoral (modelo Le5001 Letica) permite diferenciar la PAS y la PAD de los animales, ya que facilita automáticamente el valor digital de ambas medidas. Este aparato además registra también la frecuencia cardíaca de los animales y facilita también automáticamente

su valor. En esta Tesis Doctoral la medida de la PAS y de la PAD se obtenía en los animales siempre entre las 10:00 horas y las 14:00 horas, para evitar variaciones por influencia del ritmo circadiano. Además estas medidas se obtenían después de permanecer los animales durante aproximadamente una hora en una habitación aislada de ruidos, a una temperatura aproximada de 25-30 °C. Antes de colocar el manguito en la cola de los animales ésta se calentó durante 10-15 minutos con una lámpara de rayos infrarrojos. Todo ello permitía que la arteria de la cola se dilatase, y facilitaba que posteriormente obtuviésemos una buena señal en el aparato. En el estudio nº 1 el animal se colocaba además en un cepo antes de aplicar el manguito y cuando éste se había introducido en la cola se hinchaba automáticamente hasta presionarla de forma adecuada y se procedía a la medida de la PA por este método descrito por Buñag en 1973 (Buñag, 1973). En el estudio nº 2 utilizamos únicamente ratas SHR. Los animales de esta raza son especialmente nerviosos y se estresan fácilmente cuando se manipulan. Por este motivo, en dicho estudio, después de haber dilatado la arteria de la cola de las ratas éstas se anestesiaban suavemente con éter etílico, y a continuación se procedía a colocarlas el manguito para obtener la medida de la PAS y de la PAD. Este procedimiento de medida de las ratas SHR fue descrito por Dietz et al. en 1978 (Dietz et al., 1978). Existen manguitos con distintos diámetros para medir la PA por el método descrito en ratas de distinto tamaño. Concretamente el manguito utilizado en esta Tesis Doctoral nos permitía medir la PAS y la PAD de las ratas a partir de las 5 semanas de vida. Los animales se sometían ya al proceso requerido para conseguir estos valores (manipulación por parte del investigador, exposición a temperatura ambiental de 25-30 °C, exposición a la radiación infrarroja en la cola, inmovilización en el cepo, etc...) cuando tenían esa edad y así se familiarizaban con él. Estas medidas obtenidas a las 5 semanas sirvieron para el acostumbramiento de los animales pero no se incluyeron en los protocolos experimentales de nuestros estudios. En ellos mediamos semanalmente la PAS y la PAD en las ratas a partir de la 6ª semana de vida. En este momento el animal ya estaba acostumbrado al procedimiento y era previsible que las medidas resultasen fiables. El período durante el cual se medía la PA en los estudios de esta Tesis Doctoral figura en la descripción del protocolo experimental correspondiente. Los grupos de ratas destinados para las medidas de PA tenían un mínimo de 10 animales (2 jaulas de 5), lo que hacía previsible que siguiendo todas las precauciones mencionadas anteriormente, se consiguiesen al menos 6 medidas semanales de PA fiables. Como ya hemos señalado en el protocolo del estudio nº 2, cabe además recordar que en dicho estudio siempre se obtuvo la medida de la frecuencia cardíaca de los animales cuando se medía su PAS y su PAD.

3.4.- Ensayos en la preparación de "pithed rat"

La preparación de "pithed rat" se monta en nuestro laboratorio siguiendo la técnica originalmente descrita por Shipley y Tilden (Shipley y Tilden, 1947), y posteriormente por Guillespie

(Guillespies 1967, 1970). A continuación se detalla el procedimiento seguido para montar esta preparación.

La rata debe anesthesiarse antes de comenzar las manipulaciones quirúrgicas y preferiblemente debe utilizarse una anestesia suave y pasajera. Para ello en nuestro laboratorio se introduce al animal en una campana de cristal en la que previamente se ha colocado un algodón impregnado en éter dietílico. Tras esperar unos minutos la rata se duerme y en ese momento se saca al animal de la campana, pero se mantiene el algodón próximo al hocico para evitar que se despierte. La rata se coloca entonces en posición *decúbito supino*, usualmente en una cama termostatzada que permite mantener su temperatura constante a 37°C durante todo el ensayo. Alternativamente puede utilizarse calor radiante durante el ensayo para calentar al animal. En nuestro laboratorio es habitual colocar un corcho entre la cama y el animal para poder fijar después en este corcho los soportes y separadores durante la cirugía. Por ello utilizamos de hecho una lámpara para calentar al animal, y esta lámpara a su vez nos ilumina el campo quirúrgico. Una vez colocado el animal sobre el corcho, las extremidades y la cabeza se sujetan de forma adecuada a la cama antes de comenzar el procedimiento quirúrgico. Efectuamos a continuación 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. Ello permite realizar las manipulaciones que describimos a continuación. A través del ojal, se separan los músculos paratraqueales hasta dejar al descubierto la tráquea. Pasamos entonces dos hilos de sutura por debajo de la misma, uno en posición proximal y otro en posición distal, y a continuación realizamos una incisión entre dos anillos traqueales introduciendo a su través una cánula que se fija anudando los hilos. Para poder retirar cuanto antes el anestésico, procedemos entonces a descerebrar y desmedular al animal con un vástago metálico de 18 cm de largo y 1.5 mm de diámetro. Este vástago se introduce por la órbita del ojo derecho pasándolo por el *foramen magnum* hasta alcanzar el bulbo raquídeo, y a continuación se hace avanzar por el canal medular hasta el sacro, completando así la destrucción medular. Para evitar la muerte del animal conectamos inmediatamente después la cánula traqueal a un equipo de respiración asistida (Scientific & Research Instruments Ltd. "ventilador para animales pequeños"), y podemos entonces retirar ya lógicamente el algodón impregnado con éter dietílico. Ajustamos a elección el volumen y la frecuencia de respiración para que el respirador suministre un volumen de aire de 2 cc por cada 100 g de peso del animal, con una frecuencia de 50 emboladas por minuto. Pasamos a describir a continuación el proceso utilizado para controlar los cambios de PA en este animal.

Después de ajustar adecuadamente el equipo de respiración asistida, disecamos el paquete vásculo-nervioso del lado derecho formado por la arteria carótida y el nervio vago. Separamos y cortamos dicho nervio para dejar libre la arteria y la aislamos pasando por debajo

dos hilos de sutura. Ligamos el hilo situado en la parte distal, y dejamos iniciado un nudo en el hilo situado en la parte proximal. Ello permitirá fijar posteriormente una cánula en la arteria por un procedimiento similar al descrito para fijar la cánula de la traquea. Esta cánula debe estar conectada a un sistema cerrado lleno de suero fisiológico, que a su vez conecta con un transductor de presión. Debemos hacer una incisión para introducir la cánula, pero antes de hacer el corte colocamos una pinza en la arteria para evitar que el animal pierda sangre cuando realicemos el corte. Esta pinza debe situarse entre los dos hilos de sutura y debe quedar más cerca del hilo proximal. Se hace a continuación la incisión con una tijera fina, ya que el corte en la arteria debe ser pequeño, aproximadamente la mitad de su calibre. Antes de colocar la cánula introducimos por esta incisión un catéter acoplado a una jeringuilla con heparina sódica, y soltamos momentáneamente la pinza para poder llevar a cabo una administración de este fármaco. Inyectamos lentamente 400 U.I./kg de heparina sódica en un volumen de suero fisiológico de 0.4 ml para evitar la coagulación sanguínea durante el ensayo. Una vez terminada la administración de heparina, se ajusta de nuevo la pinza, se retira el sistema de inyección, y se introduce a través de la incisión la cánula de plástico. La cánula debe fijarse entonces con el hilo situado en la parte proximal, que previamente habíamos dejado preparado para anudar, sirviendo así mismo el hilo situado en la parte distal para sujetarla más firmemente. Después de fijar la cánula, se procede a retirar definitivamente la pinza arterial, y el sistema queda dispuesto para medir la PAS y la PAD. La cánula permite de hecho la conexión entre la arteria y el sistema de flujo cerrado, de forma que el flujo arterial ocasiona una onda mecánica que se transmite a lo largo de todo sistema. El transductor de presión recoge la señal mecánica, la transforma, y la manda a un sistema de adquisición de señales analógicas. Es importante realizar una calibración previa del transductor con un manómetro ordinario para asegurar la exactitud de las medidas. Para nuestros estudios los cambios en la PAS y en la PAD se registran a través del sistema de adquisición de señales analógicas Datasystem 8C Panlab (DS8C Panlab), que permite la digitalización, visualización, almacenamiento, y posterior reproducción de señales analógicas, y éste sistema consta de los siguientes elementos:

- Unidad digitalizadora de 4 canales Pb40032
- Tarjeta Pb400031
- Programa DS8C Panlab
- Ordenador
- Impresora

Este sistema permite que las señales aparezcan sobre la pantalla en tiempo real, y permite así mismo que una vez almacenadas, se puedan reproducir en pantalla o impresora. La frecuencia de muestreo para nuestros estudios en cada canal es de 50 datos por segundo.

La administración de fármacos en esta preparación se suele realizar por vía intravenosa y más concretamente en nuestro laboratorio los fármacos se administran en la vena yugular. Por este motivo, después de haber canulado la carótida de la rata, disecamos contralateralmente su vena yugular izquierda, ligándola con un hilo en su parte distal, y dejando iniciado un nudo con otro hilo en la parte proximal. Aislamos y cortamos el vago del lado izquierdo completando así una vagotomía bilateral en el animal, que nos servirá para evitar secreciones y reflejos vagales durante el ensayo. Realizamos a continuación un corte de aproximadamente la mitad del calibre de la vena con una tijera fina, para posteriormente introducir una cánula. La vena puede colapsarse después del corte, y aunque usualmente este corte puede localizarse realizando suaves tracciones con unas pinzas, en algunas ocasiones es necesario dilatar la vena con un algodón impregnado en suero fisiológico caliente para poder introducir la cánula. Una vez que se dilata la vena, introducimos la cánula en la incisión, y la fijamos anudando los hilos que habíamos colocado previamente. La cánula que se introduce en la yugular está conectada a un sistema de goteo de suero fisiológico, y para administrar los fármacos se introducen bolos en la vena de un volumen de 0.4 ml/kg. Se considera que las ratas adultas con alimentación normal tienen un peso aproximado de 250 g y por ello las disoluciones se preparan para poder inyectar siempre cada dosis prevista de fármaco en un volumen de 0.1 ml, pudiendo ajustarse de todos modos este volumen cuando el peso del animal no es el usual. Después de inyectar el fármaco en la yugular, procedemos a lavar el sistema con el goteo de suero fisiológico, dejando pasar un volumen de 0.4 ml para el arrastre completo de cada dosis.

En esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo ensayos en la preparación de "pithed rat" con animales que se alimentaban con distintas dietas y que en ocasiones recibían tratamiento farmacológico. En estos ensayos se evaluaron según los protocolos descritos para los estudios nº 1 y nº 2 los efectos presores dosis-dependientes de distintos agonistas. Administramos los fármacos en la preparación de "pithed rat" en concentraciones crecientes y acumulativas para poder de este modo construir las curvas dosis-respuesta del agonista selectivo α_1 metoxamina (10-3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), del agonista selectivo α_2 B-HT 920 (3-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y de angiotensina II (300-10000 ng/kg) en los distintos ensayos. En cada animal se obtuvo únicamente una curva dosis-respuesta, y para construirla se medían siempre los incrementos máximos de PA (PAS y PAD) que producía la administración de cada dosis utilizando las medidas que proporcionaba el sistema DS8C Panlab ya descrito. Cuando se administraban dosis bajas de metoxamina o angiotensina II, después de cada administración esperábamos hasta que el animal recuperaba los niveles previos de PAD antes de llevar a cabo una nueva administración. Las dosis altas de estos fármacos y las dosis de B-HT 920, se administraban sin embargo sin esperar a que el animal hubiese recuperado los niveles previos de PAD, ya que en estos casos la reversión del

efecto farmacológico no es fácil en un margen razonable de tiempo. Con cada agonista se llevaron a cabo un mínimo de 6 ensayos homogéneos.

Dado que cuando se realizan experimentos *in vivo* es difícil obtener el efecto máximo y el valor del pD₂ de los fármacos, cuando llevamos a cabo ensayos en la preparación de "pithed rat" se obtenía el área bajo cada curva (AUC) dosis-respuesta del agonista considerando siempre 100 el AUC de los valores medios control. Esto permitía comparar el efecto que tenían las dietas y/o el tratamiento farmacológico sobre las respuestas presoras.

3.5.- Determinación de la calcemia

Para la determinación de la calcemia la sangre se obtuvo sacrificando a los animales por decapitación después de sus anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). La sangre se recogió en tubos heparinizados, y se centrifugó a 5000 g y 2° C de temperatura durante 15 minutos. A continuación se separó el plasma para determinar el calcio plasmático y las proteínas totales.

La valoración del calcio plasmático se llevó a cabo por el método colorimétrico de la O-Cresoltaleina-Complexona, que utiliza como reactivos: R1 = Tampón (2 metilpropanol 1,5 M) y R2 = Cromógeno (Ortocresoltaleina Complexona 0.18 mM).

La valoración de las proteínas totales se llevó a cabo por el método colorimétrico de Biuret, que utiliza como reactivos: R1 = Blanco (NaOH 0.40 M; K-Na-Tartrato 64 mM) y R2 = Reactivo Biuret (NaOH 0.40 M; K-Na-Tartrato 64 mM; SO₄Cu 6.0 mM; KJ 61 mM). Se utilizó un autoanalizador Hitachi 717, calibrado previamente con el calibrador Multi de Boehringer Mannheim, utilizándose como controles de calidad Precinorm U y Precipath U de la misma casa. A partir de los valores de calcio plasmático y proteínas totales se calculó indirectamente el valor del calcio iónico mediante la fórmula de Zeisler (citado por Weissman y Pileggi, 1980). Esta fórmula para la estimación del calcio iónico aparece a continuación y es la que actualmente utiliza el Servicio de Análisis y Laboratorio Central del Hospital del Aire de Madrid, centro donde se llevaron a cabo las determinaciones analíticas anteriormente referidas.

$$\text{Ca}^{2+}/100\text{ml} = \frac{6[\text{Ca}] - (\text{PT}/3)}{\text{PT} + 6}$$

[Ca] = mg de calcio total/100ml y PT = g de proteínas/100ml.

Se hicieron siempre determinaciones de calcemia con un mínimo de 12 muestras y los valores se

expresaron en mg/100 ml y en mM para facilitar la interpretación de los resultados.

3.6.- Fármacos utilizados

En esta Tesis Doctoral se utilizaron los siguientes fármacos y compuestos:

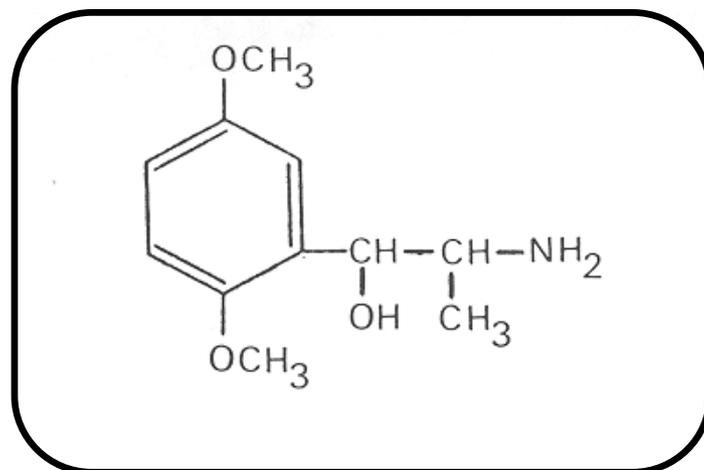
- Amlodipino besilato (Pfizer S.A.)
- Angiotensina II acetato sal (Sigma S.A.)
- B-HT 920 2CIH (Boehringer Ingelheim S.A.)
- Eter dietílico (Panreac Química S.A.)
- Heparina sódica Leo (Byk Elmu S.A.)
- Metoxamina CIH (Sigma S.A.)
- Pentobarbital sódico Euta-Lender (Normon S.A.)

Hemos creído oportuno representar también las estructuras químicas de los agonistas utilizados en los ensayos con la preparación de "pithed rat" que aparecen en la **figura 3M** (página 104). La fórmula del amlodipino figura en la página 67.

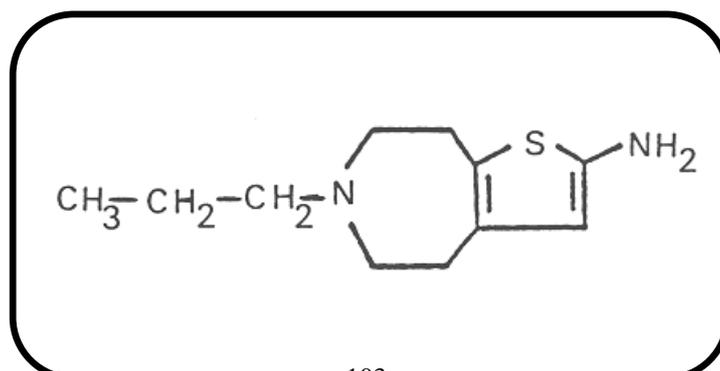
Para su administración, los fármacos se disolvieron y diluyeron diariamente en solución salina, exceptuando la angiotensina II que se disolvía en agua destilada, y el amlodipino que se disolvía semanalmente en agua corriente de Madrid. La angiotensina II es en realidad un péptido fotosensible de fácil degradación, y por ello la solución madre y las diluciones de este fármaco se hacían además inmediatamente antes de su uso y se protegían del contacto con la luz solar.

3.7.- Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados obtenidos se agruparon, y se obtuvo la media \pm el error estándar de la media (E.S.M.) para un mínimo de 6 animales o muestras homogéneas según hemos señalado en las distintas evaluaciones o determinaciones. Para comparar los datos y obtener la significación estadística se utilizó el test de la "t de Student" para datos no apareados o un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples y se consideró siempre significativa la diferencia para valores de $p < 0.05$.



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



B-HT 920: 6-alil-2-amino-5,6,7-tetrahidro-4h-tiazolo-[4,5-d]azepina

H₂N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH

Angiotensina II

Figura 3M: Estructuras químicas de los agonistas utilizados en los ensayos con la preparación de "pithed rat".

4.- RESULTADOS

4.1.- Resultados del estudio nº 1

4.1.1.- Desarrollo e ingesta de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio

Las ratas SDR de este estudio tenían un peso corporal de 56 ± 3 g ($n=10$) cuando se destetaban de sus madres a las 3 semanas de vida. En ese momento su cola medía 8.1 ± 0.1 cm. Cuando se alimentaban con la dieta control de contenido normal en calcio, ganaban peso progresivamente, y al alcanzar la edad adulta (9 semanas de vida) pesaban 369 ± 7 g ($n=10$). En ese momento su cola medía 20.0 ± 0.3 cm.

El desarrollo corporal de las ratas SDR que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, fue semejante al desarrollo corporal de las ratas SDR que se habían alimentado con la dieta control. Estos animales pesaban 365 ± 4 g ($n=10$) cuando alcanzaban la edad adulta (9 semanas de vida). En ese momento su cola medía 20.9 ± 0.6 cm.

En la **tabla 1R** (página 107), figuran los valores del peso corporal de las ratas SDR alimentadas con las dos dietas mencionadas, en distintos momentos de su vida. En la **figura 1R**, que aparece en la misma página, se representan estos valores.

Tabla 1R: Peso corporal (g) de ratas Sprague-Dawley, alimentadas con dos dietas de distinto

contenido en calcio.

SEMANAS DE VIDA	Ca 1%	Ca 2.5%
3	56 ± 3	56 ± 1
4	97 ± 4	94 ± 1
5	147 ± 4	147 ± 2
6	213 ± 5	209 ± 3
7	276 ± 4	271 ± 3
8	328 ± 5	322 ± 3
9	369 ± 7	365 ± 4

Cada valor representa la media ± E.S.M. de 10 animales. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

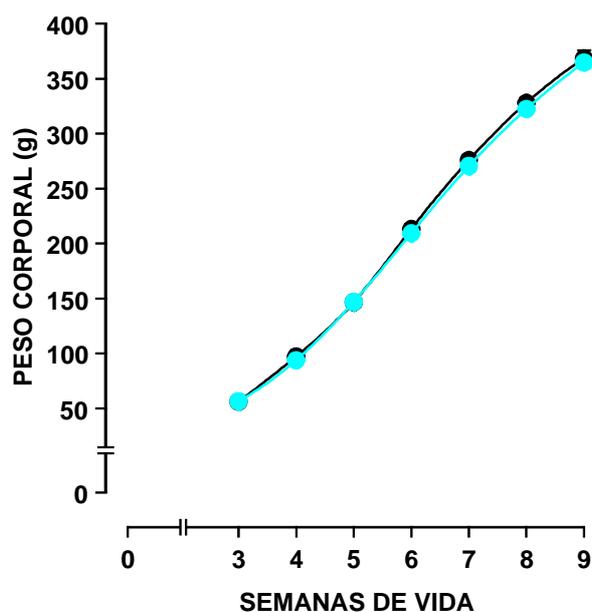


Figura 1R: Peso corporal de ratas Sprague-Dawley, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media ± E.S.M. de 10 animales. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

El consumo medio durante el período de alimentación establecido fue semejante en los dos grupos de ratas SDR, siendo el de los animales del grupo alimentado con la dieta enriquecida en calcio de 19.1 g/rata/día y el de los animales del grupo alimentado con la dieta control de 20.2 g/rata/día.

Las ratas SHR de este estudio tenían un peso corporal de 41 ± 2 g ($n=10$) cuando se destetaban de sus madres a las 3 semanas de vida. En ese momento su cola medía 7.9 ± 0.2 cm ($n=10$). Cuando se alimentaban con la dieta control de contenido normal en calcio ganaban peso progresivamente, y al finalizar en el período de alimentación (momento en el que tenían 20 semanas de vida) pesaban 331 ± 8 g ($n=10$). En ese momento su cola medía 18.6 ± 0.1 cm ($n=10$).

El desarrollo corporal de las ratas SHR de este estudio que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, fue distinto del desarrollo corporal de las ratas SHR que se habían alimentado con la dieta control, siendo mayor el incremento de peso cuando las ratas se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio. Las ratas alimentadas con esta dieta pesaban 384 ± 6 g ($n=10$) cuando tenían 20 semanas de vida. La longitud de su cola en este momento era mayor (20.0 ± 0.2 cm, $n=10$) que la de los animales de su misma raza y edad alimentados con la dieta control ($p<0.001$).

En la **tabla 2R** (página 109), figuran los valores del peso corporal de las ratas SHR alimentadas con las dos dietas mencionadas en distintos momentos de su vida. En la **figura 2R** (página 110), se representan estos valores.

Tabla 2R: Peso corporal (g) de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

SEMANAS DE VIDA	Ca 1%	Ca 2.5%
3	41 ± 2	41 ± 3
4	64 ± 2	61 ± 1
5	95 ± 2	98 ± 2
6	126 ± 3	137 ± 2 **
7	165 ± 3	189 ± 2 ***
8	199 ± 4	234 ± 3 ***
9	226 ± 4	265 ± 5 ***
10	246 ± 5	290 ± 4 ***
11	254 ± 5	301 ± 6 ***
12	263 ± 6	308 ± 5 ***
13	269 ± 7	328 ± 6 ***
14	280 ± 6	344 ± 5 ***
15	292 ± 6	353 ± 5 ***
16	308 ± 6	362 ± 4 ***
17	310 ± 6	371 ± 5 ***
18	312 ± 7	372 ± 6 ***
19	319 ± 7	383 ± 7 ***
20	331 ± 8	384 ± 6 ***

Cada valor representa la media ± E.S.M. de 10 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (**p<0.01; ***p<0.001).

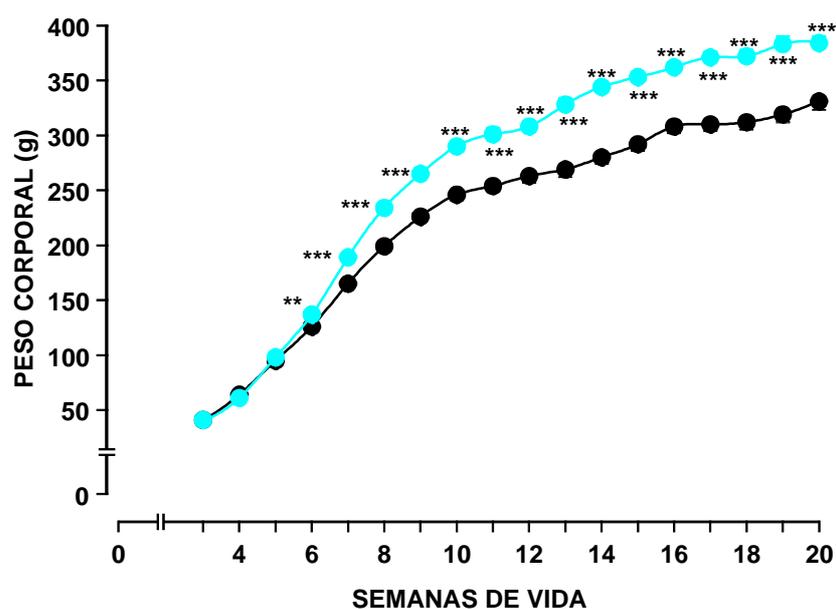


Figura 2R: Peso corporal de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. de 10 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (**p<0.01; ***p<0.001).

Aunque el consumo medio durante el período de alimentación establecido fue bastante parecido en los dos grupos de las ratas SHR, pudimos apreciar que el de los animales del grupo alimentado con la dieta enriquecida en calcio era ligeramente mayor (13.4 g/rata/día) que el de los animales del grupo alimentado con la dieta control (10.3 g/rata/día).

4.1.2.- Presión arterial de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio

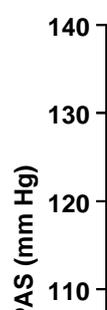
Las ratas SDR de este estudio alimentadas con la dieta control no desarrollaron hipertensión. Sus valores de PAS y de PAD a lo largo del período de alimentación establecido indicaban que esta raza era normotensa. Cuando las ratas SDR se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio pudimos observar un descenso de los valores de PA en los animales más jóvenes, existiendo diferencias significativas cuando se comparaban los valores de la PAS obtenidos en animales que tenían 6 y 7 semanas de vida, con los valores correspondientes en animales de la misma edad que se habían alimentado con la dieta control. En la edad adulta, es decir cuando los animales tenían 9 semanas de vida, los valores de PAS y los valores de PAD fueron sin embargo muy semejantes en las ratas SDR alimentadas con la dieta control, y en las ratas SDR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio. En la **tabla 3R** que aparece en esta misma página, figuran los valores de la PAS y de la PAD de las ratas SDR alimentadas con las dos dietas mencionadas, en distintos momentos de su vida. En la **figura 3R** (página

112), se representan estos valores.

Tabla 3R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), de ratas Sprague-Dawley, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

SEMANAS DE VIDA	Ca 1%		Ca 2.5%	
	PAS	PAD	PAS	PAD
6	121 ± 3	95 ± 3	108 ± 1 **	89 ± 1
7	129 ± 2	103 ± 2	119 ± 2 **	97 ± 2
8	130 ± 5	105 ± 4	123 ± 3	98 ± 3
9	129 ± 3	103 ± 3	128 ± 4	102 ± 2

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (**p<0.01).



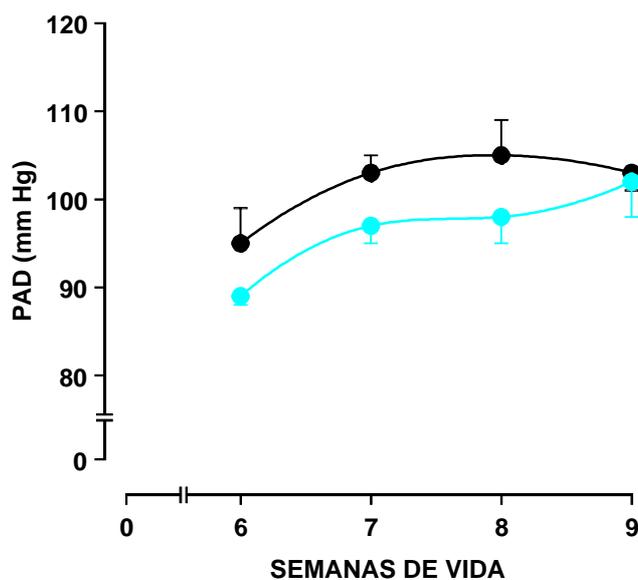


Figura 3R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (** $p < 0.01$).

Las ratas SHR de este estudio alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, presentaban ya niveles de PAS y de PAD altos cuando tenían 6 semanas de vida. Estos valores eran de hecho más altos que los valores usuales en ratas normotensas. A partir de este momento, la PAS y la PAD de estas ratas SHR aumentó gradualmente hasta que los animales tenían 11 semanas de vida. Los valores de la PAS y de la PAD comenzaron entonces a

estabilizarse, y en realidad sufrieron sólo ligeras variaciones desde este momento hasta que los animales tuvieron 20 semanas de vida. Consideramos de hecho que los animales tenían valores totalmente estables de PA cuando alcanzaban esta edad.

La dieta enriquecida en calcio retrasó claramente el desarrollo de la HTA en las ratas SHR. Los valores de la PAS de estos animales fueron siempre menores que los valores correspondientes en las ratas SHR alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, existiendo usualmente diferencia significativa entre estos valores. De hecho, las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio nunca llegaron a tener valores de PAS tan altos como los que presentaban las ratas SHR alimentadas con la dieta control durante su fase de estabilización. Los valores de la PAD fueron sin embargo semejantes en los animales más jóvenes (que tenían menos de 11 semanas de vida) de estos dos grupos. Cuando se comparaban las medidas de la PAD que se obtenían en animales que tenían edades comprendidas entre 12 y 17 semanas de vida, los valores obtenidos en las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio fueron también significativamente menores que los valores obtenidos en las ratas SHR alimentadas con la dieta control. Los valores de la PAD de estos dos grupos de animales volvían a ser semejantes al final del período de alimentación, es decir cuando las ratas SHR tenían edades comprendidas entre 18 y 20 semanas de vida. Por todo ello, y teniendo en cuenta el grado de significación estadística al comparar los valores de la PAS y de la PAD en los dos grupos, consideramos que las diferencias máximas entre la PA de las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y la PA de las ratas alimentadas con la dieta control, aparecían cuando los animales tenían edades comprendidas entre 13 y 16 semanas de vida. Los valores de la PAS y la PAD obtenidos en los animales de 15 semanas de vida podían por ello resultar representativos de la PA durante este período de alimentación. La presión diferencial o presión de pulso ($PP = PAS - PAD$) es una variable asociada a la PA y una de las expresiones del componente pulsátil de la misma.

Queremos resaltar aquí que la PP de las ratas SHR que tenían 15 semanas de vida era menor ($p < 0.01$) cuando los animales se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio (43 ± 2 , $n=6$) que cuando los animales se habían alimentado con la dieta de contenido normal en calcio (71 ± 4 , $n=6$).

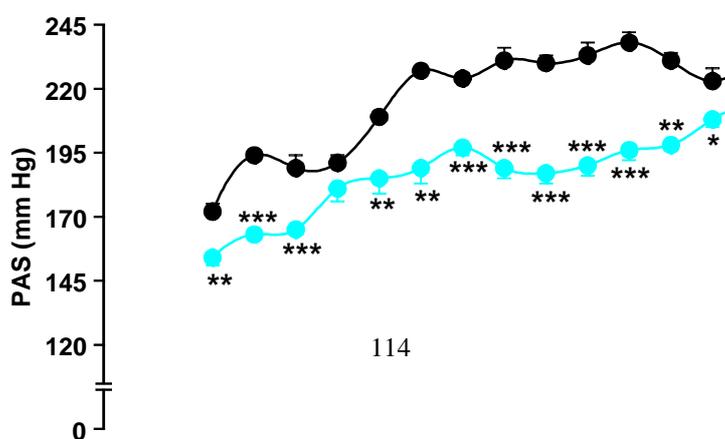
En la **tabla 4R** que aparece en esta página, figuran los valores de la PAS y de la PAD de las ratas SHR alimentadas con las dos dietas mencionadas, en distintos momentos de su vida. En la **figura 4R** (página 115), se representan estos valores.

Tabla 4R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), de ratas

espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

SEMANAS DE VIDA	Ca 1%		Ca 2.5%	
	PAS	PAD	PAS	PAD
6	172 ± 3	121 ± 1	154 ± 3 **	124 ± 3
7	194 ± 1	128 ± 3	163 ± 2 ***	131 ± 3
8	189 ± 5	140 ± 5	165 ± 2 ***	133 ± 3
9	191 ± 3	153 ± 4	181 ± 5	143 ± 6
10	209 ± 1	156 ± 4	185 ± 6 **	154 ± 5
11	227 ± 1	175 ± 6	189 ± 6 **	155 ± 7
12	224 ± 2	173 ± 1	197 ± 3 ***	166 ± 2 *
13	231 ± 5	181 ± 1	189 ± 4 ***	161 ± 4 ***
14	230 ± 3	173 ± 1	187 ± 4 ***	157 ± 4 **
15	233 ± 5	171 ± 6	190 ± 4 ***	148 ± 4 **
16	238 ± 4	179 ± 3	196 ± 4 ***	159 ± 4 **
17	231 ± 3	179 ± 2	198 ± 2 **	170 ± 4 *
18	223 ± 5	179 ± 3	208 ± 3 *	174 ± 3
19	229 ± 6	170 ± 5	214 ± 2 *	175 ± 4
20	225 ± 5	175 ± 5	211 ± 3 *	169 ± 2

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).



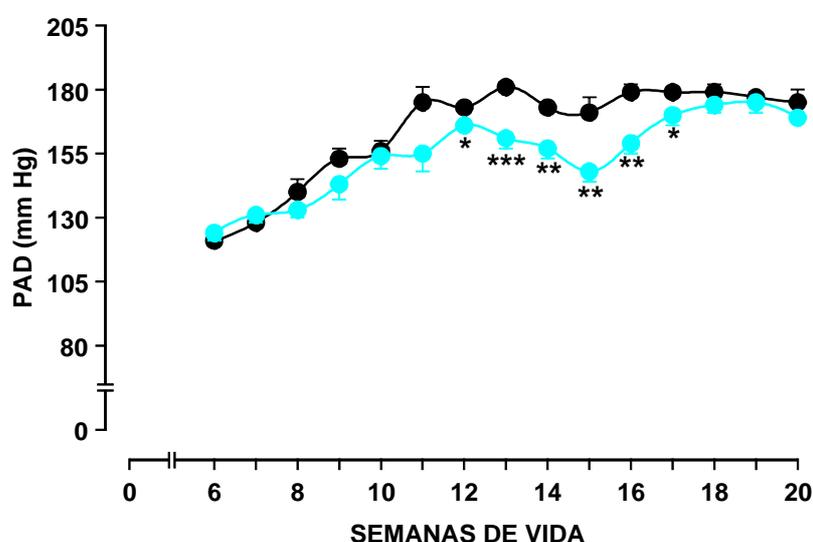


Figura 4R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta control Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

4.1.3.- Calcemia de ratas Sprague-Dawley, y ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio

Hemos señalado en el apartado anterior que la modificación máxima de la PA producida por la dieta enriquecida en calcio en las ratas SDR, se observó cuando los animales tenían 9 semanas de vida (final del período de alimentación). Consideramos así mismo relevante la modificación de la PA producida por esa dieta en las ratas SHR que tenían 15 y 20 semanas de vida (final del período de alimentación). Se llevaron por ello a cabo determinaciones de calcemia en los animales de ambas razas que tenían respectivamente estas edades.

La dieta enriquecida en calcio ocasionó un aumento de la calcemia en las ratas SDR de este estudio. Los valores de calcio total y calcio iónico, en el plasma de las ratas SDR de 9 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, fueron de hecho significativamente mayores que los correspondientes valores de calcio total y calcio iónico, en el plasma de los animales de esta misma raza y edad alimentados con la dieta control. En la **tabla 5R** (página 117), figuran los valores de la calcemia obtenidos en las ratas SDR de 9 semanas de vida, alimentadas con las dos dietas mencionadas. En la **figura 5R** (página 118), se representan estos valores en histogramas.

La calcemia de las ratas SHR fue siempre menor que la de las ratas SDR. Pudimos apreciar además que el calcio plasmático total de las ratas SHR alimentadas con la dieta control de contenido normal en calcio, aumentaba ligeramente con la edad de los animales, resultando algo mayores los niveles de calcio plasmático total de las ratas SHR de 20 semanas de vida, que los de los animales de esta raza alimentados con la misma dieta que tenían 15 semanas de vida. Los niveles de calcio iónico en el plasma de las ratas SHR alimentadas con la dieta control, fueron sin embargo muy semejantes en los animales de 15 y 20 semanas de vida, siendo incluso ligeramente menores en los segundos. Los valores de la calcemia de las ratas SHR de este estudio figuran conjuntamente con los de las ratas SDR en la **tabla 5R** (página 117), y se representan así mismo en la **figura 5R** (página 118).

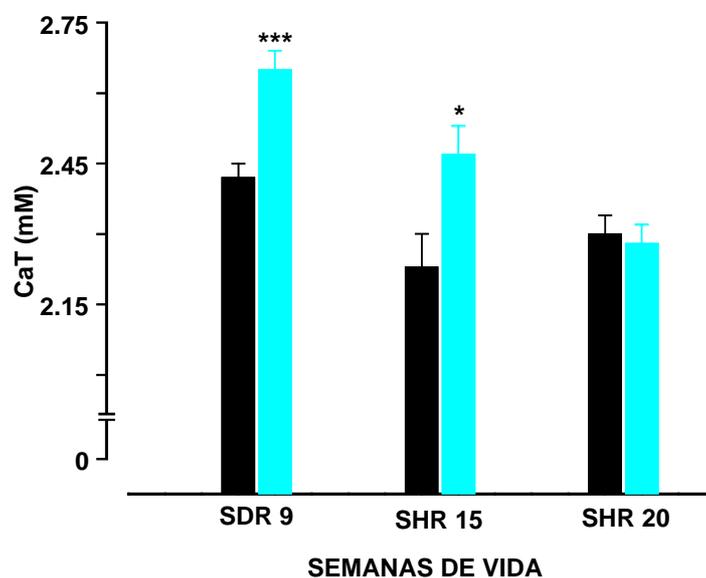
La dieta enriquecida en calcio ocasionó también un aumento de la calcemia en las ratas SHR de 15 semanas de vida. Los valores de calcio total y de calcio iónico, en el plasma de las ratas SHR de esta edad alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, fueron de hecho significativamente mayores que los correspondientes valores de calcio total y de calcio iónico, en el plasma de los animales de esta misma raza y edad alimentadas con la dieta control. Sin embargo, los valores de calcio total y de calcio iónico, en el plasma de las ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, fueron semejantes a los correspondientes valores de calcio total y de calcio iónico, obtenidos en el plasma de las ratas de esta misma raza y edad alimentadas con la dieta control (ver **tabla 5R** y **figura 5R**).

Tabla 5R: Niveles plasmáticos de calcio total (Ca_T) y de calcio iónico (Ca^{2+}), de ratas Sprague-Dawley (SDR) de 9 semanas de vida, y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

	Ca 1%	Ca 2.5%
--	-------	---------

SDR 9 semanas		
Ca_T (mM); (mg/dl)	2.42 ± 0.03; 9.68 ± 0.12	2.65 ± 0.04; 10.60 ± 0.15 ***
Ca²⁺ (mM); (mg/dl)	1.21 ± 0.01; 4.84 ± 0.05	1.31 ± 0.02; 5.24 ± 0.07 ***
SHR 15 semanas		
Ca_T (mM); (mg/dl)	2.23 ± 0.08; 8.91 ± 0.30	2.47 ± 0.06; 9.87 ± 0.22 *
Ca²⁺ (mM); (mg/dl)	1.15 ± 0.04; 4.58 ± 0.15	1.26 ± 0.02; 5.03 ± 0.07 *
SHR 20 semanas		
Ca_T (mM); (mg/dl)	2.30 ± 0.04; 9.20 ± 0.14	2.28 ± 0.04; 9.12 ± 0.17
Ca²⁺ (mM); (mg/dl)	1.13 ± 0.01; 4.50 ± 0.04	1.17 ± 0.03; 4.67 ± 0.11

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 12 muestras homogéneas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (*p<0.05; ***p<0.001).



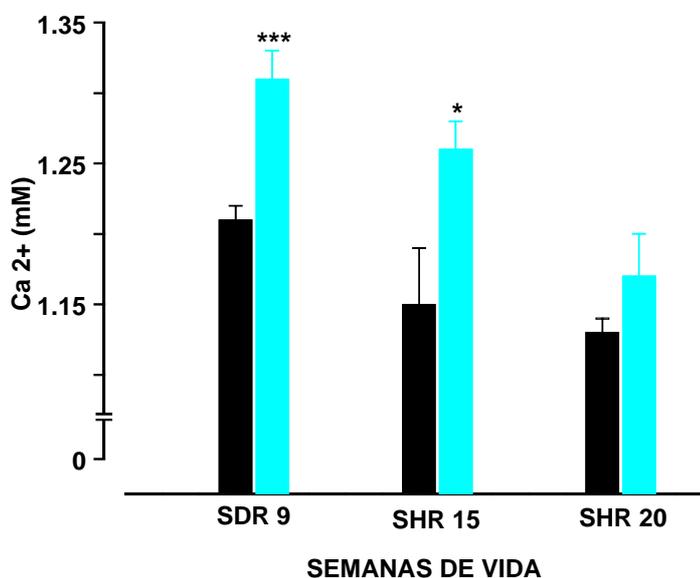


Figura 5R: Histogramas de los niveles plasmáticos de calcio total (Ca_T) y de calcio iónico (Ca^{2+}), de ratas Sprague-Dawley (SDR) de 9 semanas de vida, y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (v) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (v). Los histogramas representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 12 muestras homogéneas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

4.1.4.- Reactividad vascular de ratas Sprague-Dawley, y de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio

En este estudio la reactividad vascular, al igual que la calcemia, se evaluó en las ratas SDR de 9 semanas de vida, y también en las ratas SHR de 15 y 20 semanas de vida. Es decir, en los momentos de la vida, en los que se habían observado cambios relevantes de la PA en los distintos grupos de ratas. Comentaremos en primer lugar el efecto que tuvo la destrucción del SNC sobre la PAS y la PAD de las ratas de los distintos grupos, y expondremos a continuación los resultados obtenidos en ellas cuando se administraban los agonistas después de montar la preparación de "pithed rat".

Cuando se destruyó el SNC de las ratas SDR, y también cuando se destruyó el SNC de las ratas SHR, se produjo una brusca caída de la PA, reduciéndose mucho los niveles de la PAS y de la PAD de todos estos animales. En ambas razas, pudimos apreciar que la

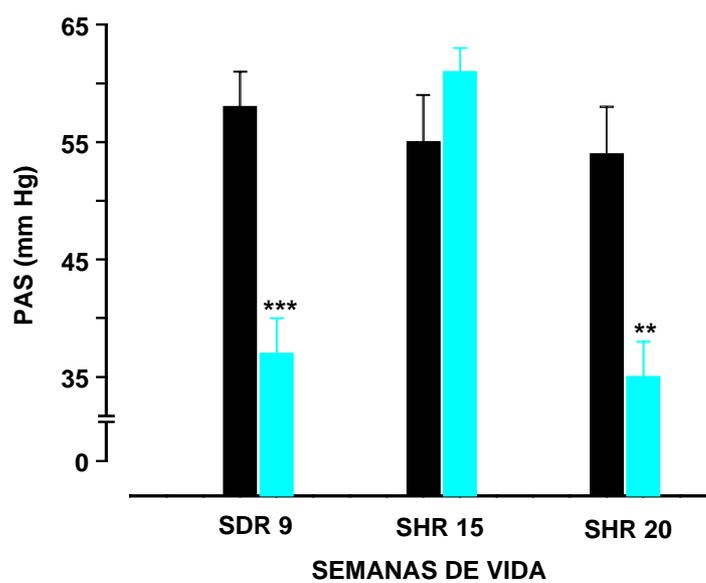
disminución de la PAS y de la PAD producida al destruir el SNC al finalizar el período de alimentación, era mayor en los animales que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio. En las ratas SHR este efecto de la dieta enriquecida en calcio se apreció únicamente en este momento de la vida, es decir únicamente cuando los animales tenían 20 semanas de vida. Por el contrario, la disminución de la PAS y de la PAD, al destruir el SNC de las ratas SHR de 15 semanas de vida, fue semejante cuando se utilizaban animales alimentados con la dieta control, y cuando se utilizaban animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio

En la **tabla 6R** (página 120), figuran los valores de la PAS y de la PAD, obtenidos después de destruir el SNC de las ratas SDR de 9 semanas de vida, y también figuran los valores de la PAS y de la PAD, obtenidos después de destruir el SNC de las ratas SHR de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas en ambos casos con las dos dietas mencionadas. En la **figura 6R** (página 121), se representan estos valores en histogramas. En esta tabla y en esta figura puede observarse que la disminución de la PAS y de la PAD, al destruir el SNC de las ratas SDR adultas de 9 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, fue mayor que la disminución de la PAS y de la PAD al destruir el SNC de las ratas SDR de esta misma edad que se habían alimentado con la dieta control. En esta tabla y en esta figura puede también observarse que cuando se destruía el SNC de las ratas SHR de 20 semanas de vida, la caída de la PAS y de la PAD era también mayor en los animales que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio.

Tabla 6R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), después de destruir el sistema nervioso central de ratas Sprague-Dawley (SDR) de 9 semanas de vida, y después de destruir el sistema nervioso central de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

	Ca 1%	Ca 2.5%
SDR 9 semanas		
PAS	58 ± 3	37 ± 3 ***
PAD	47 ± 3	28 ± 2 ***
SHR 15 semanas		
PAS	55 ± 4	61 ± 2
PAD	38 ± 3	40 ± 4
SHR 20 semanas		
PAS	54 ± 4	35 ± 3 **
PAD	39 ± 3	26 ± 3 **

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



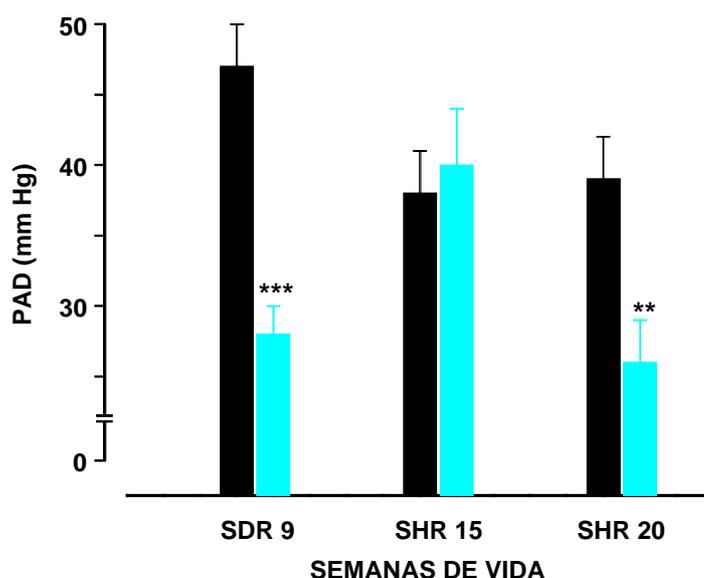


Figura 6R: Histogramas de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), después de destruir el sistema nervioso central de ratas Sprague-Dawley (SDR) de 9 semanas de vida, y después de destruir el sistema nervioso central de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (v) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (v). Los histogramas representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

La administración del agonista α_1 , metoxamina, en la preparación de "pithed rat", ocasionó incrementos presores dosis-dependientes. Las respuestas presoras de metoxamina en esta preparación, fueron mucho menores cuando se utilizaban ratas SDR adultas de 9 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que cuando se utilizaban ratas de la misma edad y raza alimentadas con la dieta control. En la **tabla 7R**, que aparece en esta página, figuran los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban ratas SDR de 9 semanas de vida alimentadas con las dos dietas mencionadas. En la **figura 7R** (página 123), se representan las correspondientes curvas dosis-respuesta de metoxamina obtenidas en estos animales. Existió diferencia significativa, cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de metoxamina, en animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio, y las correspondientes AUC de dicho agonista en animales alimentados con la dieta control ($p < 0.001$)

Tabla 7R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	13.9 ± 3.0	12.4 ± 3.1	11.4 ± 4.8	10.4 ± 4.5
30	28.3 ± 2.9	26.6 ± 3.2	22.7 ± 4.5	15.8 ± 3.3
100	63.6 ± 3.9	57.9 ± 4.5	53.1 ± 9.5	43.7 ± 6.8
300	137.9 ± 5.2	116.3 ± 4.6	89.6 ± 9.8	62.0 ± 5.3
1000	187.8 ± 4.1	139.5 ± 2.9	109.3 ± 8.5	67.5 ± 5.5
3000	191.9 ± 3.9	142.9 ± 2.2	117.1 ± 14.3	71.7 ± 6.3

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

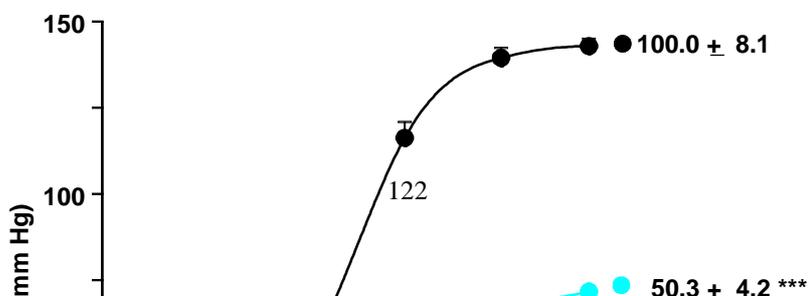
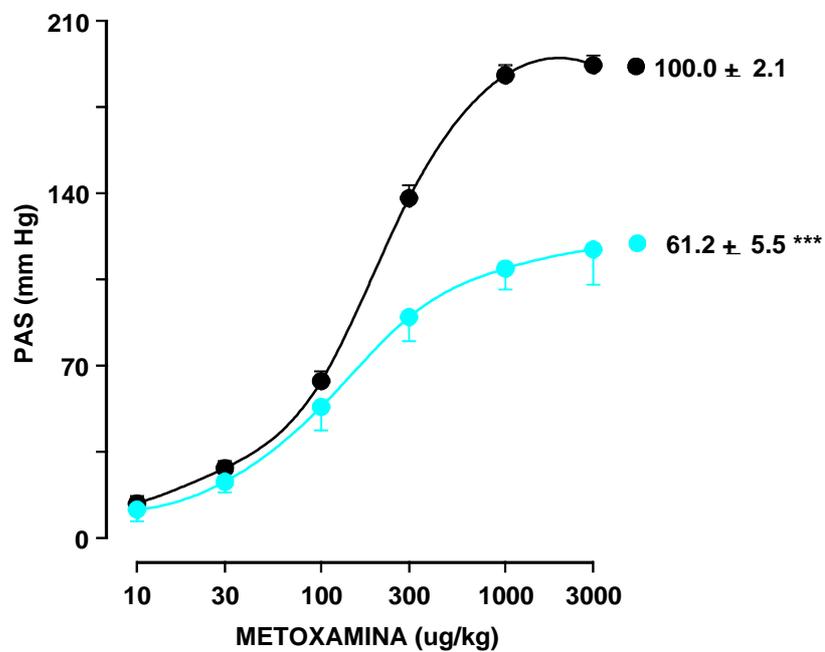


Figura 7R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por metoxamina en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (***) ($p < 0.001$).

La administración del agonista α_2 , B-HT 920, en la preparación de “pithed rat”, ocasionó también incrementos presores dosis-dependientes. Al igual que sucedía con metoxamina, las respuestas presoras de B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, fueron mucho menores cuando se utilizaban ratas SDR adultas de 9 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que cuando se utilizaban ratas de la misma edad y raza alimentadas con la dieta control. En la **tabla 8R**, que aparece en esta página, figuran los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, cuando se utilizaban ratas SDR de 9 semanas de vida alimentadas con las dos dietas mencionadas. En la **figura 8R** (página 125), se representan las correspondientes curvas dosis-respuesta de B-HT 920 obtenidas en estos animales. Existió diferencia significativa, cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de B-HT 920, en animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio, y las correspondientes AUC de dicho agonista en animales alimentados con la dieta control ($p < 0.001$).

Tabla 8R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

	Ca 1%	Ca 2.5%
--	-------	---------

DOSIS ($\mu\text{g/kg}$)	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	11.4 ± 1.1	10.3 ± 1.2	6.6 ± 1.4	5.7 ± 1.3
10	19.0 ± 1.8	17.8 ± 2.0	16.0 ± 2.4	14.8 ± 1.9
30	34.0 ± 3.4	31.1 ± 2.8	29.7 ± 4.7	25.7 ± 3.8
100	56.5 ± 5.7	49.7 ± 3.3	48.2 ± 6.9	38.9 ± 4.8
300	84.2 ± 5.2	68.0 ± 3.1	51.8 ± 6.9	41.6 ± 4.7
1000	96.9 ± 4.5	71.9 ± 3.2	55.4 ± 6.5	44.9 ± 4.7

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

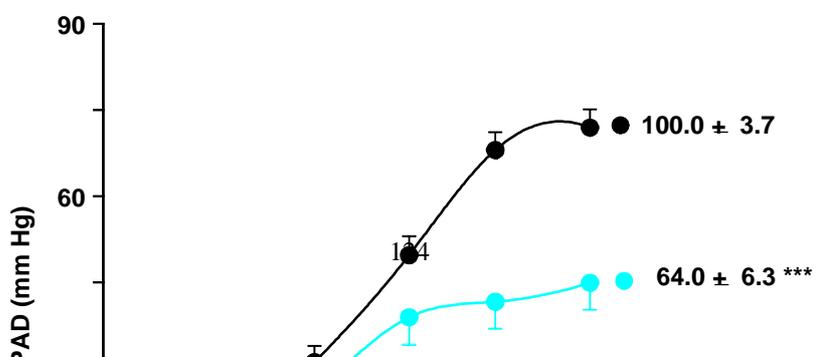
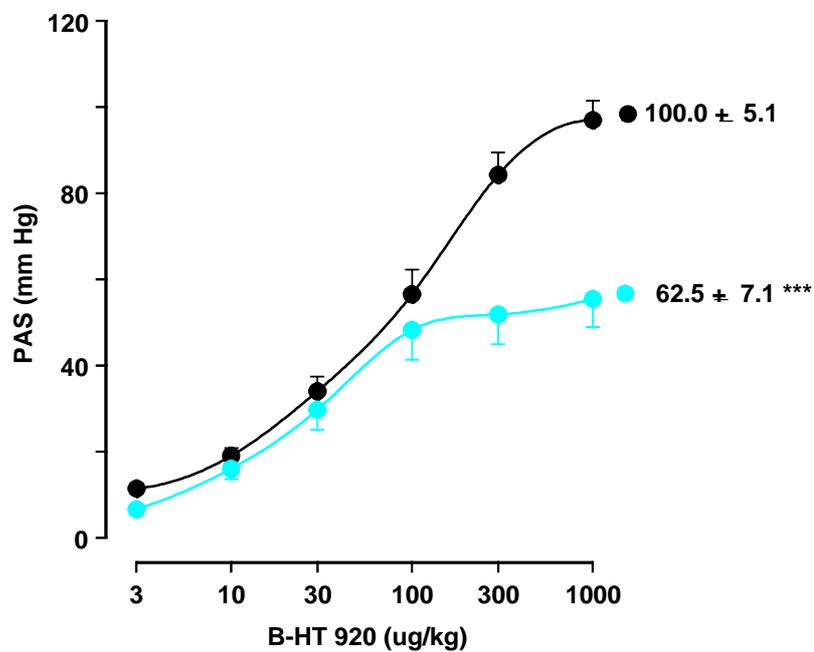


Figura 8R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: dieta control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (***) $p < 0.001$).

La administración de angiotensina II en la preparación de "pithed rat", ocasionó también incrementos presores dosis-dependientes. Las respuestas presoras de angiotensina II en la preparación de "pithed rat", fueron semejantes cuando se utilizaban ratas SDR adultas de 9 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y cuando se utilizaban ratas de la misma edad y raza alimentadas con la dieta control. En la **tabla 9R**, que aparece en esta página, figuran los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por angiotensina II en la preparación de "pithed rat" cuando se utilizaban ratas SDR de 9 semanas de vida alimentadas con las dos dietas mencionadas. En la **figura 9R** (página 127), se representan las correspondientes curvas dosis-respuesta de angiotensina II, obtenidas en estos animales. No existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de angiotensina II en animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio, y las correspondientes AUC de dicho agonista en animales alimentados con la dieta control.

Tabla 9R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
100	16.1 \pm 2.0	17.1 \pm 2.5	11.8 \pm 2.0	13.4 \pm 1.8
300	31.1 \pm 7.4	29.1 \pm 6.3	20.6 \pm 3.6	21.7 \pm 2.9

1000	52.0 ± 8.6	43.7 ± 7.2	47.7 ± 6.3	42.4 ± 5.3
3000	76.5 ± 15.4	57.2 ± 11.0	69.8 ± 7.9	54.3 ± 6.7
10000	86.1 ± 16.2	64.2 ± 11.7	81.6 ± 4.6	60.9 ± 5.1
30000	95.9 ± 17.4	68.0 ± 12.5	99.1 ± 7.3	72.4 ± 8.5

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

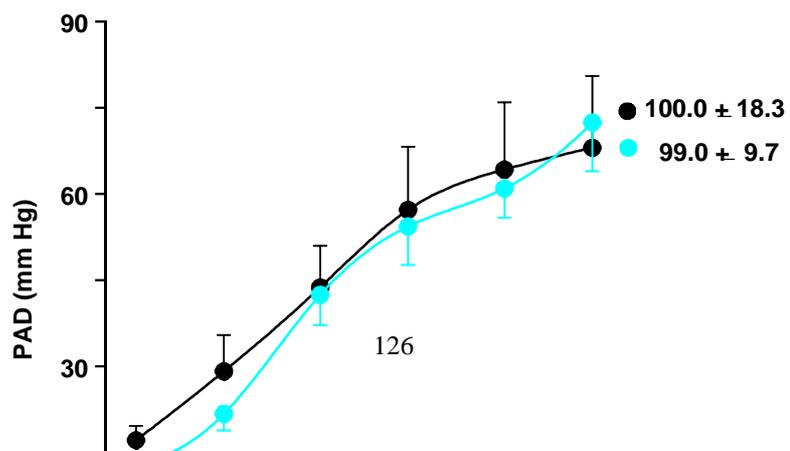
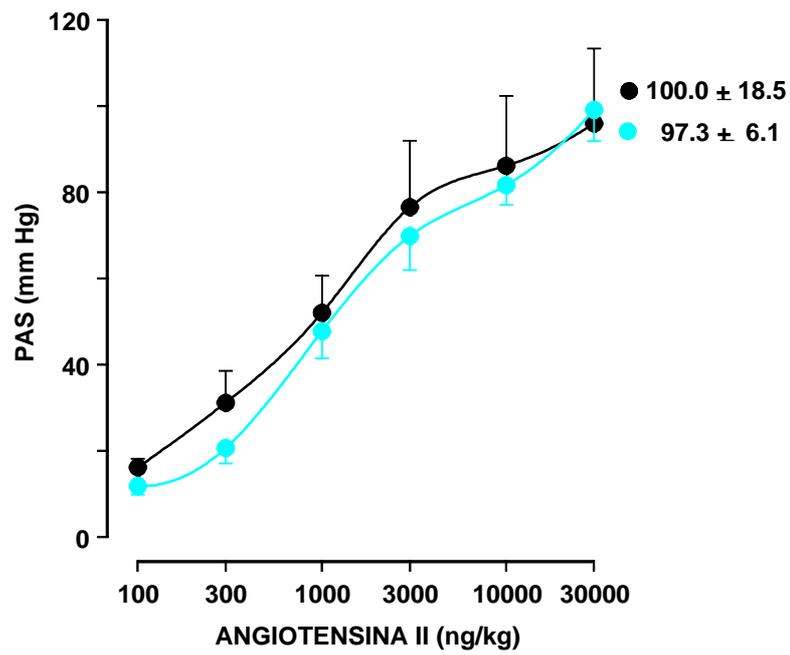


Figura 9R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas Sprague-Dawley de 9 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

Al igual que sucedía con las ratas SDR, en las ratas SHR pudimos también apreciar modificaciones de la reactividad vascular cuando aumentaba la ingesta de calcio. Indicaremos más adelante los cambios en las respuestas de los distintos agonistas en la preparación de "pithed rat", cuando se modificaba el contenido de calcio en la dieta de las ratas SHR. Queremos sin embargo señalar antes que cuando se utilizaban ratas SHR de distintas edades alimentadas con la dieta control para montar la preparación de "pithed rat", se apreciaban también diferencias en las respuestas presoras del agonista α_1 metoxamina. Más concretamente, pudimos observar que las respuestas presoras de metoxamina en la preparación de "pithed rat", eran mayores en las ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta control, que en las ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con esta dieta. No pudimos sin embargo apreciar un aumento de las respuestas presoras de B-HT 920 cuando aumentaba la edad de los animales de esta raza que se alimentaban con la dieta control, y las respuestas presoras de angiotensina II en la preparación de "pithed rat", también fueron semejantes en las ratas SHR de 15 y 20 semanas de vida.

En las **tablas 10R, 11R y 12R** (páginas 129 y 130), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD, producidos por metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban ratas SHR de 15 y 20 semanas de vida alimentadas con la dieta control. En la **figura 10R** (página 131), se representan las correspondientes curvas dosis-respuesta de estos agonistas obtenidas en estos animales. Las AUC del incremento de PAS y de PAD de metoxamina en animales de 15 semanas de vida, fueron menores que las correspondientes AUC de metoxamina en animales de 20 semanas de

vida, y la diferencia fue significativa al comparar las AUC de los incrementos de PAD ($p < 0.01$). No existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de B-HT920, y de angiotensina II, en animales de 15 semanas de vida, y las correspondientes AUC de estos agonistas en animales de 20 semanas de vida.

Tabla 10R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta control de contenido normal en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15 semanas		20 semanas	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	9.2 \pm 3.2	8.3 \pm 3.9	9.4 \pm 1.3	8.7 \pm 1.6
30	19.7 \pm 4.8	21.2 \pm 5.5	19.8 \pm 2.8	18.5 \pm 3.3
100	55.7 \pm 14.1	52.8 \pm 12.5	66.3 \pm 5.6	66.2 \pm 7.3
300	126.8 \pm 21.3	104.3 \pm 15.0	169.9 \pm 9.0	154.1 \pm 6.7
1000	198.6 \pm 22.7	132.6 \pm 14.3	239.2 \pm 4.7	194.4 \pm 5.5
3000	220.0 \pm 28.0	141.1 \pm 13.2	252.7 \pm 8.0	199.8 \pm 6.6

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 11R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta control de contenido normal en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15 semanas		20 semanas	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	10.7 \pm 1.5	8.4 \pm 1.7	9.2 \pm 1.8	8.4 \pm 2.0
10	19.7 \pm 3.3	18.9 \pm 3.9	16.2 \pm 2.5	14.5 \pm 3.0
30	30.0 \pm 5.0	31.0 \pm 5.3	27.5 \pm 5.2	26.6 \pm 5.4

100	45.5 ± 7.2	46.0 ± 7.9	48.6 ± 8.0	46.1 ± 7.6
300	73.6 ± 11.2	67.3 ± 10.0	65.1 ± 11.2	63.1 ± 10.5
1000	90.5 ± 12.1	80.1 ± 10.5	79.1 ± 11.9	71.3 ± 9.7

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 12R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 y 20 semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta control de contenido normal en calcio.

DOSIS (µg/kg)	15 semanas		20 semanas	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
100	24.6 ± 2.9	23.6 ± 2.4	27.8 ± 3.5	29.0 ± 4.5
300	33.4 ± 3.8	32.8 ± 4.5	41.0 ± 3.4	40.9 ± 4.3
1000	64.8 ± 7.5	60.0 ± 6.3	71.2 ± 3.2	67.7 ± 3.6
3000	86.6 ± 12.3	80.5 ± 10.8	98.5 ± 7.0	89.4 ± 4.0
10000	106.2 ± 10.8	102.0 ± 9.1	108.2 ± 13.8	99.4 ± 8.4
30000	121.4 ± 10.5	108.9 ± 9.45	120.1 ± 13.4	106.6 ± 9.1

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

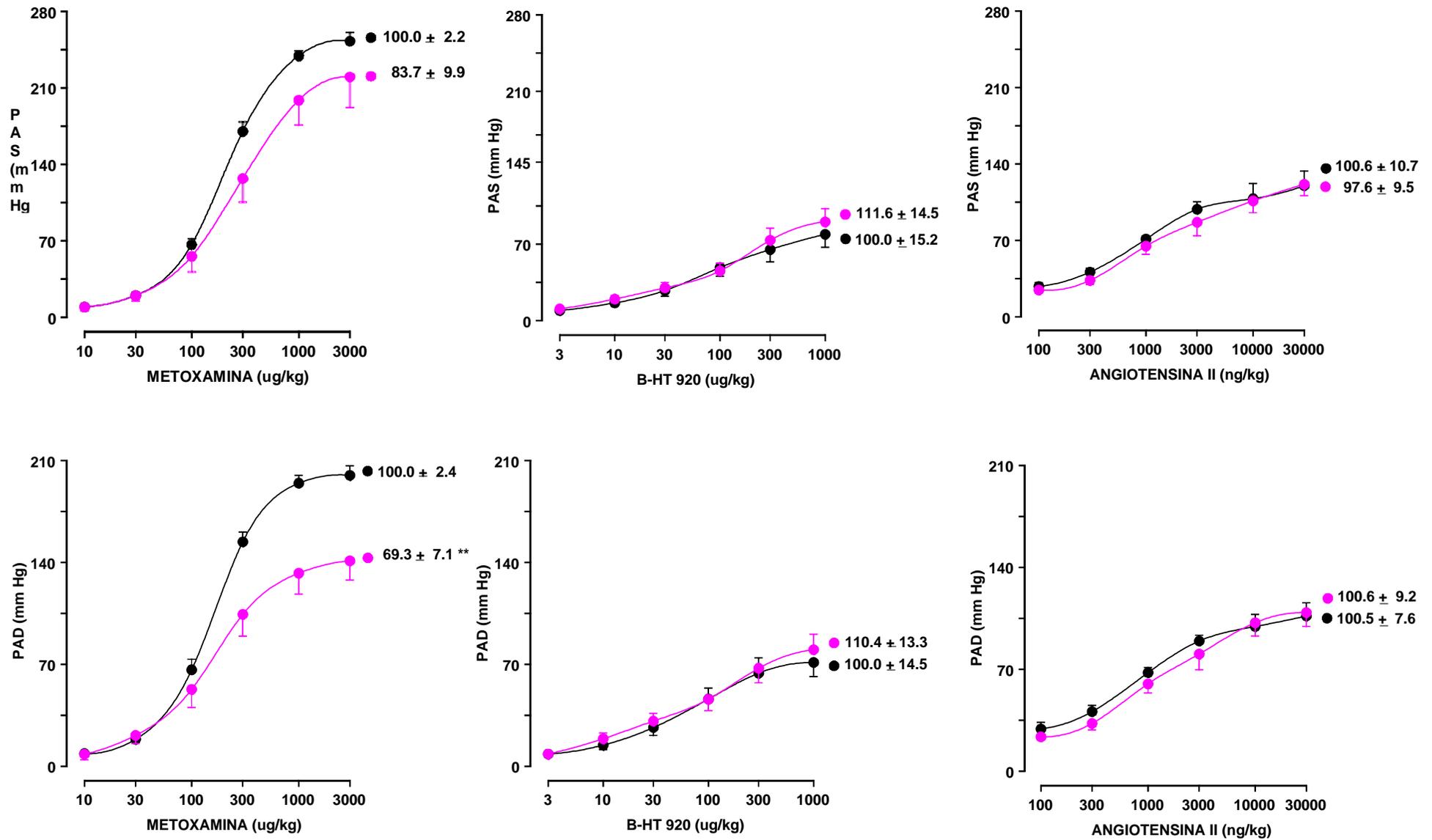


Figura 10R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 (λ) y 20 (λ) semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta control de contenido normal en calcio. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha

Expondremos a continuación los resultados obtenidos con los agonistas en la preparación de "pithed rat", cuando utilizábamos ratas SHR alimentadas con las distintas dietas. Pudimos comprobar que las respuestas presoras de metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", eran semejantes cuando se utilizaban ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y cuando se utilizaban ratas de la misma raza y edad alimentadas con la dieta control. Por el contrario, las respuestas presoras de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", fueron mucho menores cuando se utilizaban ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que cuando se utilizaban ratas de la misma raza y edad alimentadas con la dieta control. Las respuestas presoras de angiotensina II en la preparación de "pithed rat", fueron sin embargo mayores cuando se utilizaban ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que cuando se utilizaban ratas de la misma raza y edad alimentadas con la dieta control.

En las **tablas 13R, 14R y 15R** (páginas 133, 135 y 137), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD, producidos por metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con las dos dietas mencionadas. En las **figuras 11R, 12R y 13R** (páginas 134, 136 y 138), se representan respectivamente las correspondientes curvas dosis-respuesta de estos agonistas obtenidas en estos animales. No existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista en ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y las correspondientes AUC del mismo agonista en ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con la dieta control.

En las **tablas 16R, 17R y 18R** (páginas 139, 141 y 143), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II,

en la preparación de “pithed rat”, cuando se utilizaban ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con las dos dietas mencionadas. En la **figuras 14R, 15R y 16R** (páginas 140, 142 y 144), se representan respectivamente las correspondientes curvas dosis-respuesta de estos agonistas obtenidas en estos animales. Existió diferencia significativa, cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de metoxamina y B-HT 920 en ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y las correspondientes AUC de estos agonistas en ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta control ($p < 0.01$). Las AUC del incremento de PAS y de PAD de angiotensina II en ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, fueron mayores que las correspondientes AUC de angiotensina II en ratas SHR de 20 semanas de vida alimentadas con la dieta control, y la diferencia fue significativa al comparar las AUC de los incrementos de PAS ($p < 0.05$).

Tabla 13R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	9.2 \pm 3.2	8.3 \pm 3.9	12.5 \pm 2.8	11.9 \pm 3.1
30	19.7 \pm 4.8	21.2 \pm 5.5	22.6 \pm 3.6	21.1 \pm 3.7
100	55.7 \pm 14.1	52.8 \pm 12.5	65.6 \pm 15.7	72.5 \pm 23.3
300	126.8 \pm 21.3	104.3 \pm 15.0	144.0 \pm 31.2	121.7 \pm 30.5
1000	198.6 \pm 22.7	132.6 \pm 14.3	190.7 \pm 23.2	147.6 \pm 25.3
3000	220.0 \pm 28.0	141.1 \pm 13.2	198.8 \pm 23.0	152.3 \pm 25.8

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

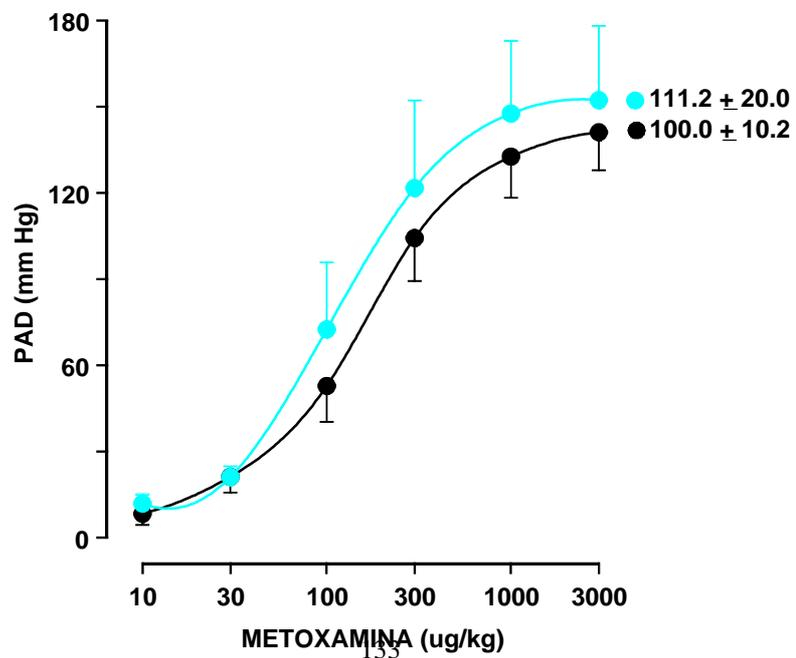
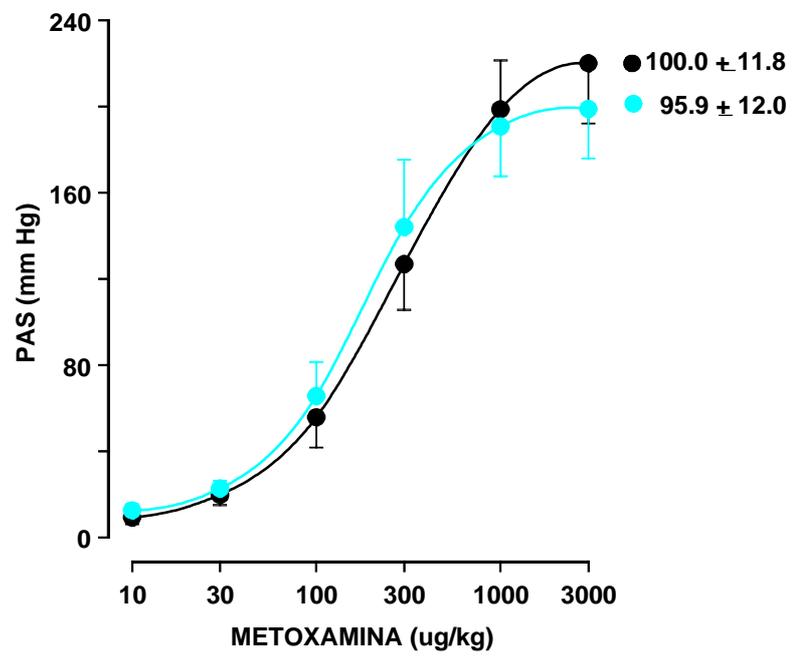


Figura 11R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

Tabla 14R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	10.7 \pm 1.5	8.4 \pm 1.7	14.2 \pm 4.6	14.6 \pm 4.9
10	19.7 \pm 3.3	18.9 \pm 3.9	24.9 \pm 7.8	17.5 \pm 4.8
30	30.0 \pm 5.0	31.0 \pm 5.3	45.8 \pm 15.4	38.5 \pm 9.7
100	45.5 \pm 7.2	46.0 \pm 7.9	61.8 \pm 13.5	52.7 \pm 8.6
300	73.6 \pm 11.2	67.3 \pm 10.0	93.5 \pm 17.2	75.3 \pm 14.2
1000	90.5 \pm 12.1	80.1 \pm 10.5	93.5 \pm 17.2	75.9 \pm 11.2

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

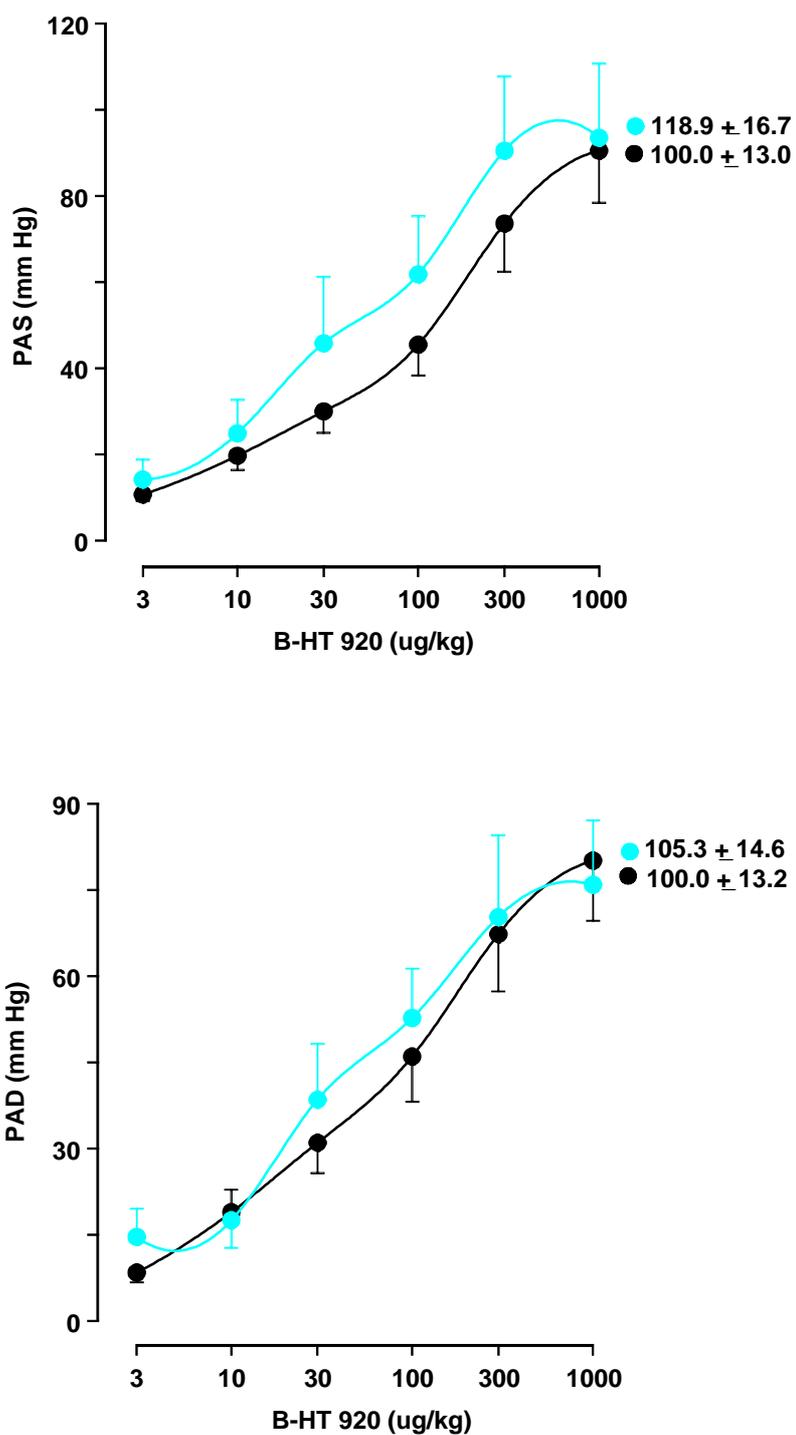


Figura 12R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por B-HT 920 en la preparación de

“pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

Tabla 15R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por angiotensina II en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
100	24.6 \pm 2.9	23.6 \pm 2.4	34.0 \pm 6.7	37.1 \pm 6.4
300	33.4 \pm 3.8	32.8 \pm 4.5	53.6 \pm 7.7	49.7 \pm 7.3
1000	64.8 \pm 7.5	60.0 \pm 6.3	77.9 \pm 10.1	77.5 \pm 7.8
3000	86.6 \pm 12.3	80.5 \pm 10.8	125.8 \pm 18.6	99.7 \pm 9.8
10000	106.2 \pm 10.8	102.0 \pm 9.1	151.3 \pm 20.3	121.1 \pm 13.6
30000	121.4 \pm 10.5	108.9 \pm 9.45	159.4 \pm 20.4	129.9 \pm 14.0

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

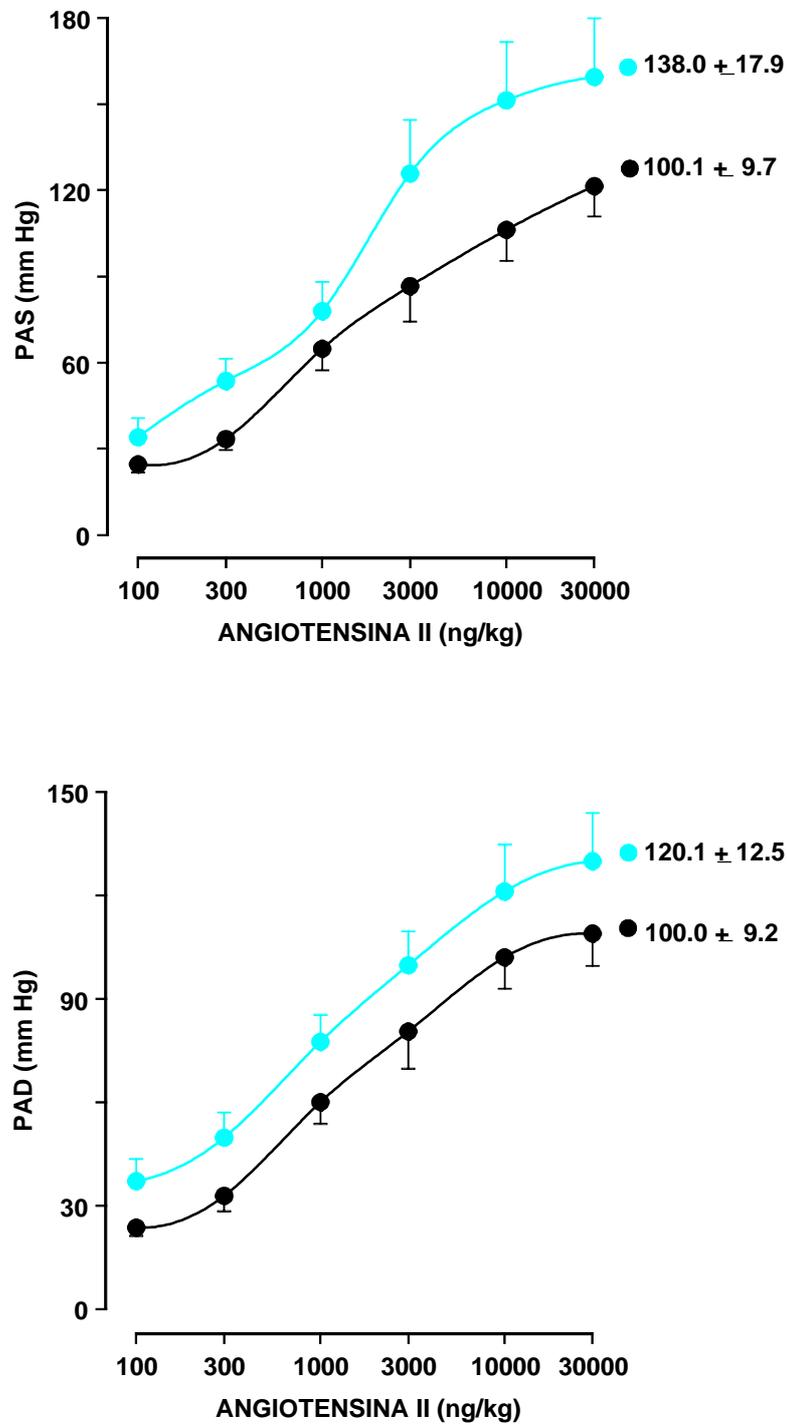


Figura 13R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido

normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales alimentados con las dos dietas, utilizando el test de la "t de Student".

Tabla 16R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	9.4 \pm 1.3	8.7 \pm 1.6	10.7 \pm 4.1	8.3 \pm 2.7
30	19.8 \pm 2.8	18.5 \pm 3.3	10.7 \pm 2.9	8.3 \pm 2.3
100	66.3 \pm 5.6	66.2 \pm 7.3	29.0 \pm 7.1	28.9 \pm 6.3
300	169.9 \pm 9.0	154.1 \pm 6.7	65.3 \pm 14.0	61.5 \pm 11.4
1000	239.2 \pm 4.7	194.4 \pm 5.5	108.4 \pm 21.9	94.7 \pm 11.4
3000	252.7 \pm 8.0	199.8 \pm 6.6	113.7 \pm 21.4	94.7 \pm 11.4

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

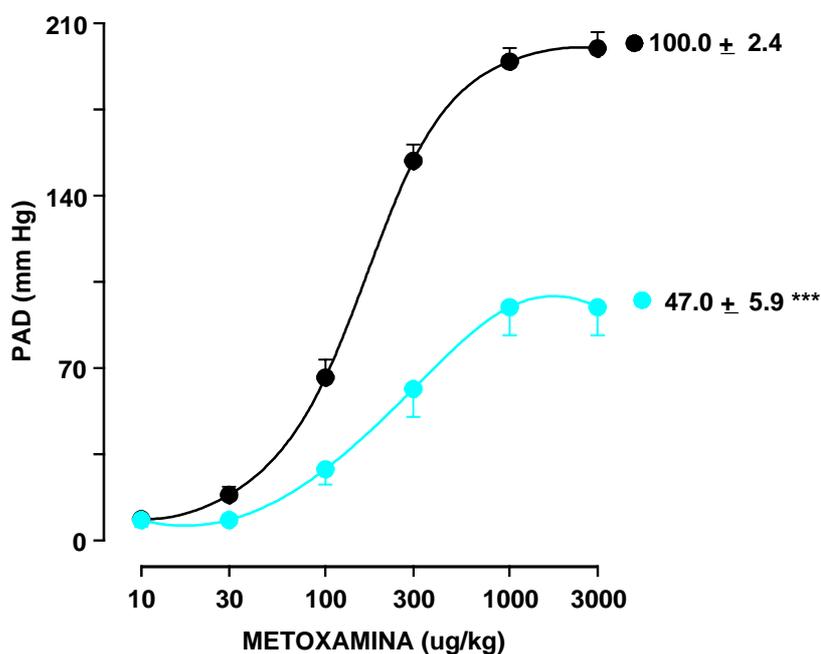
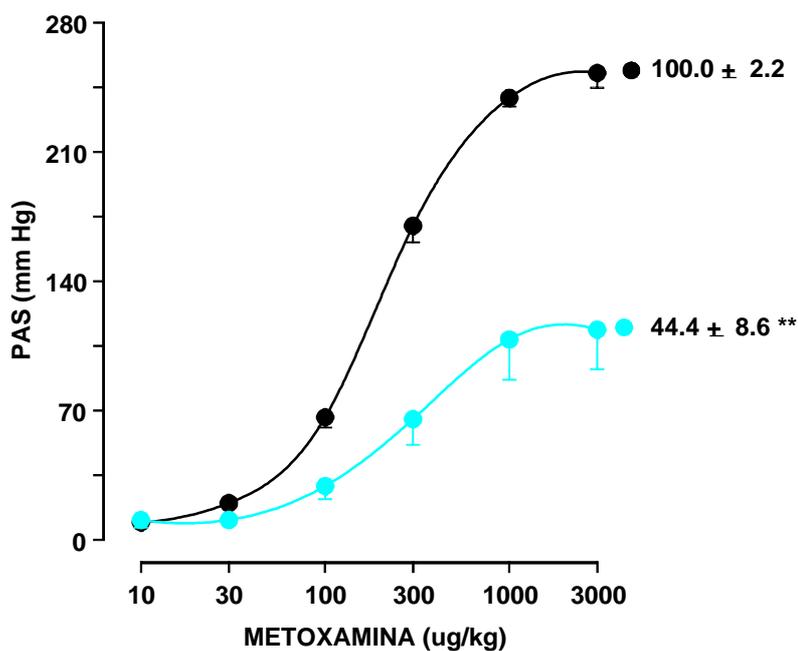


Figura 14R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con las dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tabla 17R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g/kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	9.2 \pm 1.8	8.4 \pm 2.0	3.0 \pm 0.9	3.0 \pm 1.0
10	16.2 \pm 2.5	14.5 \pm 3.0	7.1 \pm 1.5	6.4 \pm 1.2
30	27.5 \pm 5.2	26.6 \pm 5.4	9.2 \pm 1.4	9.2 \pm 1.2
100	48.6 \pm 8.0	46.1 \pm 7.6	13.4 \pm 1.6	12.4 \pm 1.3
300	65.1 \pm 11.2	63.1 \pm 11.0	16.1 \pm 1.7	14.7 \pm 1.12
1000	79.1 \pm 11.9	71.3 \pm 9.7	19.2 \pm 2.0	19.0 \pm 1.8

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

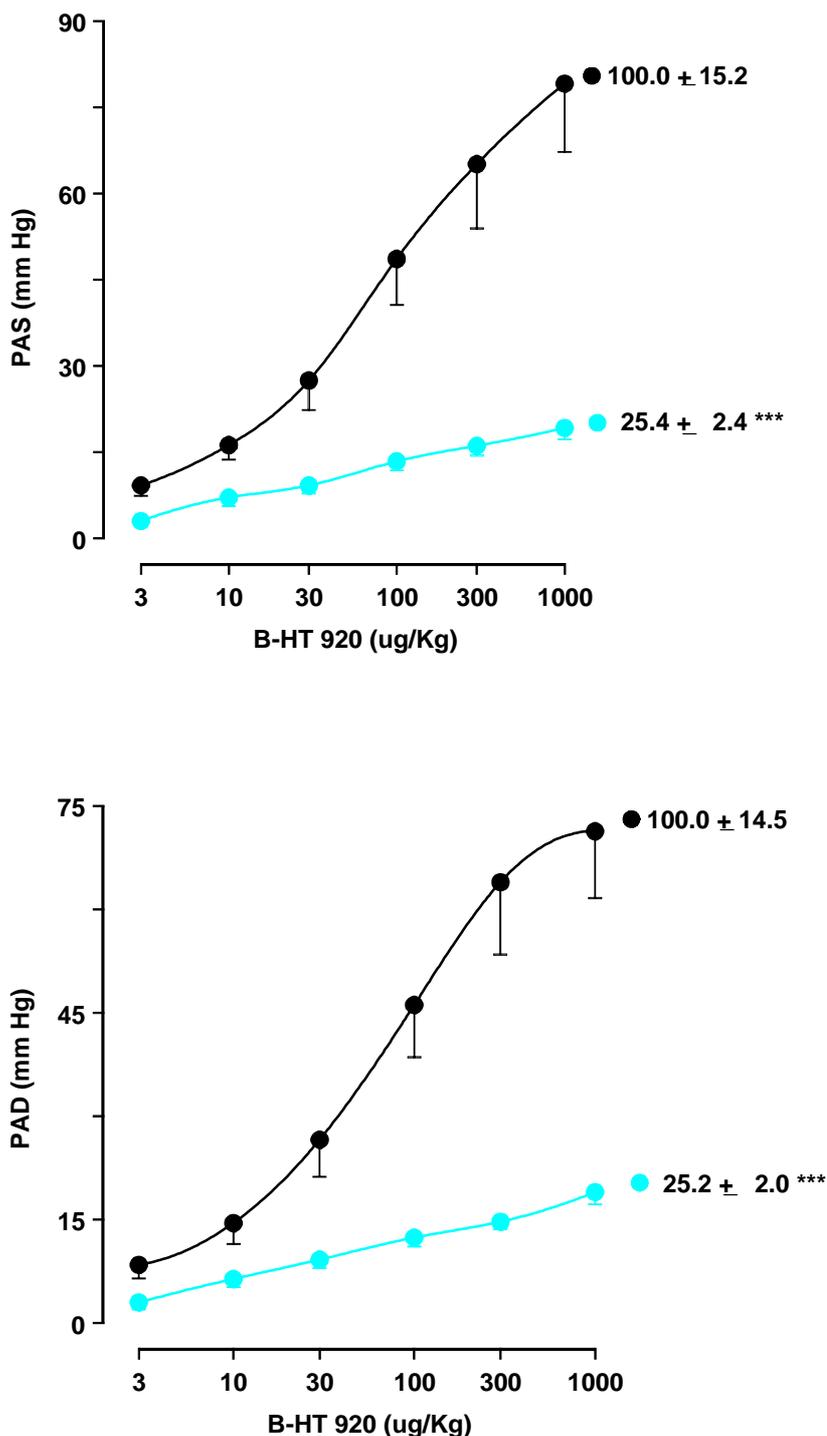


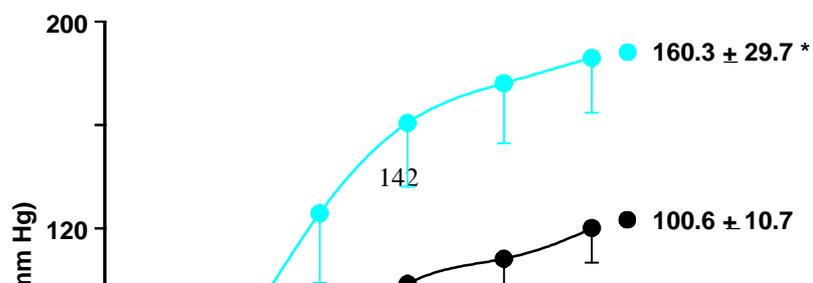
Figura 15R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (***) ($p < 0.001$).

Tabla 18R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto

contenido en calcio.

DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
100	27.8 ± 3.5	29.0 ± 4.5	40.1 ± 8.7	36.7 ± 7.2
300	41.0 ± 3.4	40.9 ± 4.3	70.6 ± 13.3	58.5 ± 9.5
1000	71.2 ± 3.2	67.7 ± 3.6	125.8 ± 27.0	101.5 ± 19.3
3000	98.5 ± 7.1	89.4 ± 4.0	160.7 ± 24.6	134.5 ± 21.8
10000	108.2 ± 13.8	99.4 ± 8.4	176.1 ± 23.2	148.7 ± 22.4
30000	120.1 ± 13.4	106.6 ± 9.1	185.9 ± 21.2	156.2 ± 21.1

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.



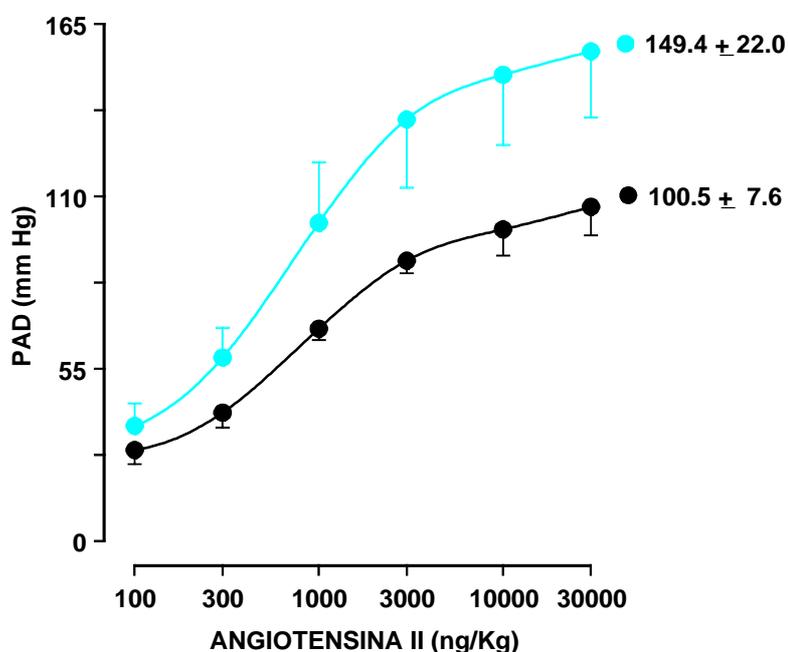


Figura 16R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producido por angiotensina II en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 20 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio: control de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) y enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta Ca 1%, utilizando el test de la "t de Student" (* $p < 0.05$).

4.2.- Resultados del estudio nº 2

4.2.1.- Desarrollo e ingesta de ratas espontáneamente hipertensas, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino,

o no recibían tratamiento farmacológico

Las ratas SHR de este estudio tenían un peso corporal de 41 ± 2 g ($n=10$) cuando se destetaban de sus madres a las 3 semanas de vida. En ese momento su cola medía 7.4 ± 0.2 cm ($n=10$). Cuando se alimentaban con la dieta control de contenido normal en calcio ganaban peso progresivamente, y al finalizar el período de alimentación establecido para este estudio (momento en el que tenían 25 semanas de vida) pesaban 360 ± 12 g ($n=10$). En ese momento su cola medía 19.2 ± 0.2 cm ($n=10$).

El desarrollo corporal de las ratas SHR de este estudio que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, fue distinto del desarrollo corporal de las ratas SHR que se habían alimentado con la dieta control, siendo mayor el incremento de peso cuando las ratas se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio. Las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio pesaron 396 ± 12 g ($n=10$) cuando tenían 25 semanas de vida. A pesar de ello, la longitud de su cola en este momento era semejante (19.3 ± 0.2 cm, $n=10$) a la de los animales de su misma raza y edad alimentados con la dieta control.

Las ratas SHR de este estudio alimentadas con la dieta control de contenido normal en calcio que se trataban con amlodipino, se desarrollaban de forma semejante a las ratas SHR de este estudio que se habían alimentado con dicha dieta, pero que no se habían tratado con ningún fármaco. Las ratas SHR alimentadas con la dieta control de contenido normal en calcio, que se trataban con amlodipino, pesaban 375 ± 9 g ($n=10$) cuando tenían 25 semanas de vida. En ese momento su cola medía 19.0 ± 0.1 cm ($n=10$).

Las ratas SHR de este estudio alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que se trataban además con amlodipino, ganaron peso durante las primeras semanas de vida de forma más rápida que los animales alimentados con la dieta control que no recibían tratamiento farmacológico. Sin embargo, al finalizar el período de alimentación (momento en el que tenían 25 semanas de vida), las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio tratadas con amlodipino, tenían un peso corporal muy parecido (366 ± 11 g, $n=10$) al de las ratas alimentadas con la dieta control que no recibían tratamiento farmacológico. En este momento la longitud de su cola era también semejante (19.5 ± 0.2 cm, $n=10$) a la de los animales de su misma raza y edad alimentados con la dieta control.

En la **tabla 19R** (página 147), figuran los valores del peso corporal de los cuatro grupos de ratas SHR establecidos en este estudio, en distintos momentos de su vida. En la **figura 17R**

(página 148), se representan estos valores.

Aunque el consumo medio de los animales de los distintos grupos durante el período de alimentación establecido fue bastante parecido, pudimos apreciar que el consumo medio de los animales de los grupos alimentados con la dieta enriquecida en calcio, era ligeramente mayor (15.7 g/rata/día) que el consumo medio de los animales de los grupos alimentados con la dieta control (13.4 g/rata/día).

4.2.2.- Presión arterial y frecuencia cardíaca, de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino, o no recibían tratamiento farmacológico

Antes de presentar los valores de la PAS y de la PAD de las ratas de este estudio, creemos que es importante recordar que en él estos valores se obtuvieron anestesiando antes superficialmente a los animales con éter dietílico. Los valores de la PAS y de la PAD, así obtenidos en las ratas SHR alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, que no se

trataban con ningún fármaco (grupo de animales considerado control para este estudio), fueron ligeramente menores que los valores correspondientes obtenidos en el estudio nº 1 en animales conscientes de la misma raza y edad alimentadas con la misma dieta que tampoco recibían tratamiento farmacológico. Cuando las ratas del grupo control tenían 6 semanas de vida, los valores de la PAS y de la PAD que obteníamos después de anestesiarse ligeramente con éter dietílico a los animales, eran a pesar de todo, mayores que los valores de la PAS y de la PAD usuales en ratas normotensas. Pudimos también comprobar que los valores de la PAS y de la PAD así medidos, aumentaban con la edad, y en los animales del grupo control estas variables comenzaban a estabilizarse sólo a partir de las 17 semanas de vida. Es decir, los valores de la PAS y de la PAD que medíamos en estos animales anestesiados superficialmente, se estabilizaron más tarde que las medidas de estas variables obtenidas en el estudio nº 1 en ratas conscientes de la misma raza (ver la **tabla 20R** de la página 153, y la **figura 18R** de la página 154).

La dieta enriquecida en calcio ocasionó una disminución de la PAS y de la PAD en las ratas SHR. El tratamiento con amlodipino también ocasionó una disminución de estas variables. La disminución se apreció sin embargo más tarde con el tratamiento farmacológico, que con la dieta enriquecida en calcio. Pudimos de hecho comprobar que con las condiciones de medida establecidas, a partir de las 13 semanas de vida, se apreciaba un descenso en los valores de la PAS y de la PAD en las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio que no recibían tratamiento farmacológico, existiendo desde este momento usualmente diferencia significativa, al comparar los valores de la PAS y de la PAD de estos animales, con los correspondientes valores de PAS y de PAD de los animales de la misma edad del grupo control (ver la **tabla 20R** de la página 153, y la **figura 18AR** de la página 154).

Como ya hemos indicado, el tratamiento con amlodipino ocasionó también una disminución de la PAS y de la PAD en las ratas SHR, y con las condiciones de medida establecidas, esta disminución se apreció más tarde que la disminución de la PAS y de la PAD ocasionada por la dieta enriquecida en calcio. De hecho, pudimos observar que cuando las ratas SHR se alimentaban con la dieta de contenido normal en calcio, y se trataban con amlodipino, los valores de la PAS y de la PAD obtenidos en los animales que tenían menos de 17 semanas de vida, fueron muy semejantes a los valores de la PAS y de la PAD obtenidos en las ratas SHR de la misma edad del grupo control. Los valores de la PAS y de la PAD obtenidos a partir de las 17 semanas de vida en los animales alimentados con la dieta de contenido normal en calcio, que se trataban con amlodipino, eran sin embargo, significativamente menores que los valores correspondientes de PAS y de PAD en los animales de la misma edad del grupo control (ver la **tabla 20R** de la página 153, y la **figura 18BR** de la página 154).

La administración simultánea de la dieta enriquecida en calcio y amlodipino, ocasionó también un descenso de la PAS y de la PAD en las ratas SHR. Este descenso se apreció en los animales que tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida. Con las condiciones de medida establecidas en este estudio, pudimos de hecho observar que los valores de la PAS y de la PAD de las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio que tenían estas edades, eran más bajos cuando los animales habían ingerido amlodipino desde el momento del destete, que cuando no habían recibido tratamiento con este fármaco. Durante esta etapa de la vida, el grupo de animales que recibía simultáneamente tratamiento con la dieta enriquecida en calcio y con amlodipino, presentaba los valores más bajos de PAS y de PAD. Cuando comparamos los valores de la PAS y de la PAD de los animales de este grupo, con los valores de la PAS y de la PAD de los animales del grupo control, comprobamos que la diferencia era estadísticamente significativa todas las semanas a lo largo de este período. Los animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio que tenían edades comprendidas entre 19 y 25 semanas de vida, presentaban por el contrario valores de PAS y de PAD mayores cuando habían ingerido amlodipino desde el momento del destete, que cuando no habían recibido tratamiento con este fármaco. Durante esta etapa de la vida, los valores de la PAS y de la PAD del grupo de ratas que recibía simultáneamente tratamiento con la dieta enriquecida en calcio y con amlodipino, fueron incluso algo mayores que los valores correspondientes en los animales de la misma raza y edad del grupo control (ver la **tabla 20R** de la página 153, y la **figura 18CR** de la página 154).

En base a los resultados expuestos en el párrafo anterior, hemos comprobado que existen dos períodos, definidos respectivamente por el tiempo transcurrido entre las 13 y las 18 semanas de vida, y por el tiempo transcurrido entre las 19 y las 25 semanas de vida, en los que aparecen modificaciones importantes y contrarias de la PA cuando las ratas SHR reciben tratamiento simultáneo con la dieta enriquecida en calcio y amlodipino. Creemos que los valores de la PAS y de la PAD obtenidos en los animales de 16 y 23 semanas de vida, pueden resultar representativos para comparar la PA de los cuatro grupos de ratas SHR en estos períodos. Por ello, en la **tabla 21R** (página 155), se representan los valores de la PAS y de la PAD obtenidos en las ratas SHR de 16 y 23 semanas de vida los cuatro grupos. En la **figura 19R** (página 156), se representan estos valores en histogramas. En esta tabla y en esta figura, vemos que cuando los animales tenían 16 semanas de vida, el grupo de ratas SHR que mostraba menores valores de PA era el de las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio que habían recibido tratamiento con amlodipino, existiendo en ese momento diferencia significativa entre los valores de la PAS de este grupo de animales y los valores de la PAS de los restantes grupos. La PAD de este grupo de animales fue también en ese momento

significativamente menor que la PAD de los animales del grupo control, y fue así mismo también ligeramente menor que la PAD de los otros dos grupos de ratas. Esta tabla y esta figura señalan también que cuando los animales tenían 23 semanas de vida, el grupo de ratas SHR alimentado con la dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino, era por el contrario el que mostraba mayores valores de PAS y de PAD. En ese momento de la vida, existió sin embargo únicamente diferencia significativa entre los valores de la PAD de este grupo de ratas, y los valores de la PAD de los grupos alimentado con la dieta de contenido normal en calcio tratado con amlodipino, y alimentado con la dieta enriquecida en calcio que no había recibido tratamiento farmacológico.

Queremos resaltar aquí que cuando las ratas SHR de este estudio tenían 16 semanas de vida, la PP era menor ($p < 0.05$) en el grupo que se trataba únicamente con la dieta enriquecida (42 ± 1 , $n=6$) en calcio que en el grupo control (49 ± 2 , $n=6$). La PP del grupo tratado con la dieta enriquecida en calcio y con amlodipino (33 ± 1 , $n=6$) también fue algo menor que la PP del grupo control, y en este caso la diferencia fue incluso mayor.

En este estudio hemos medido también semanalmente la frecuencia cardíaca de las ratas SHR anestesiadas. La frecuencia fue ligeramente mayor en los animales jóvenes de todos los grupos, y disminuyó algo las últimas semanas del estudio. Apreciamos además que los animales que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, y también los que se trataban con amlodipino, tenían valores usualmente mayores de frecuencia cardíaca, que los animales del grupo control que se alimentaban con la dieta de contenido normal en calcio y no se trataban con ningún fármaco. Ya hemos señalado que durante el período comprendido entre las 13 y las 18 semanas de vida, los animales que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, que recibían además tratamiento con amlodipino, presentaban valores de PAS y de PAD más bajos que los animales de los restantes grupos. Durante este período de tiempo, estos animales tenían así mismo frecuencias cardíacas mayores que las de los restantes grupos. La diferencia entre la frecuencia cardíaca de los animales alimentados con la dieta enriquecida en calcio tratados simultáneamente con amlodipino, y la frecuencia cardíaca de los animales de la misma edad del grupo control, fue de hecho estadísticamente significativa todas las semanas durante este período de tiempo (ver **tabla 20R** de la página 153).

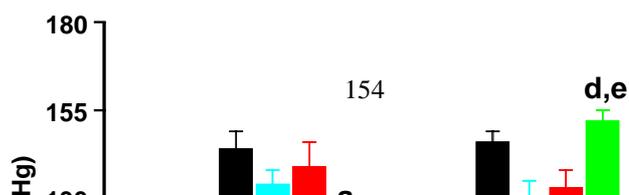
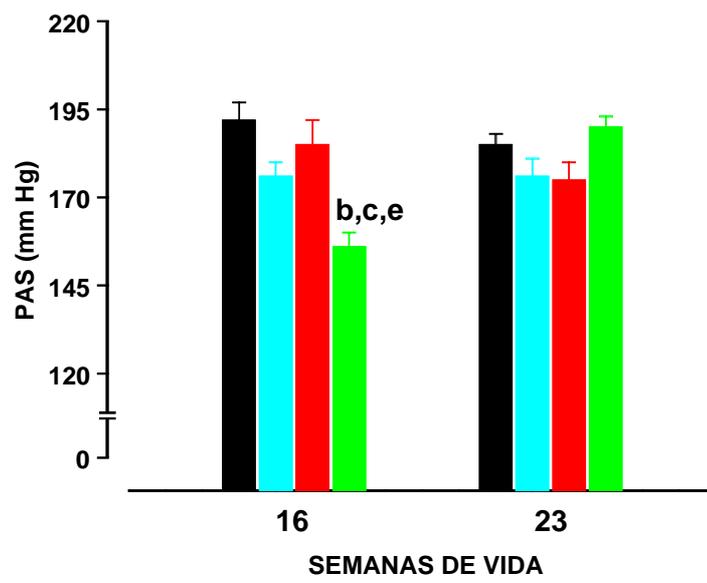


Figura 19R: Histogramas de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (v), alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (v), alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (v), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (v). Los histogramas representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Las letras indican diferencias significativas entre los valores obtenidos en los animales de los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^ap<0.05; ^bp<0.001 vs Ca 1%; ^cp<0.05; ^dp<0.01 vs Ca 2.5%; ^ep<0.01 vs Ca 1% + amlodipino).

4.2.3.- Calcemia de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico

Hemos señalado en el apartado anterior que los valores de la PAS y de la PAD en los animales de 16 y 23 semanas de vida, podían resultar representativos para comparar la PA de los distintos grupos de ratas SHR de este estudio. Hemos estudiado también en los animales de estas edades las modificaciones de otras variables, y más concretamente hemos estudiado en ellos las modificaciones de la calcemia ocasionadas alternativamente por la administración de la dieta enriquecida en calcio, por la administración de amlodipino, y por la administración simultánea de esta dieta y este fármaco.

En este estudio pudimos apreciar que el calcio plasmático total de las ratas SHR del grupo control (grupo alimentado con la dieta de contenido normal en calcio que no se trataba farmacológicamente), aumentaba ligeramente con la edad de los animales. Por el contrario, los niveles de calcio iónico en el plasma de estas ratas disminuían ligeramente con la edad de los animales. Cabe recordar que en el estudio nº 1 también sucedía esto con los animales de esta

raza que se mantenían en estas mismas condiciones. En la **tabla 22R** (página 159), figuran los valores de la calcemia de las ratas SHR de 16 y 23 semanas de vida del grupo control. En la **figura 20R** (página 160), se representan esos valores en histogramas.

Al igual que sucedía en el estudio nº 1, la dieta enriquecida en calcio ocasionó también un aumento de la calcemia en las ratas SHR de este estudio. Los valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de las ratas SHR de 16 semanas de vida, que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y que no habían recibido tratamiento farmacológico, fueron mayores que los correspondientes valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de los animales de esta misma edad del grupo control. Existió sin embargo únicamente diferencia significativa, cuando se comparaban los valores de calcio plasmático total de estos dos grupos de animales ($p < 0.05$). Los valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de las ratas SHR de 23 semanas de vida, que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y que no habían recibido tratamiento farmacológico, fueron así mismo algo mayores que los correspondientes valores de calcio total y de calcio iónico, obtenidos en el plasma de los animales de esta misma edad del grupo control. No existió sin embargo significación estadística al comparar estos valores

En este estudio pudimos apreciar que el tratamiento con amlodipino ocasionaba también un aumento de la calcemia en las ratas SHR, y este aumento pudo apreciarse en los animales alimentados con ambas dietas. Los valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de las ratas SHR de 16 y 23 semanas de vida, que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y que habían recibido tratamiento con amlodipino, fueron significativamente mayores que los correspondientes valores de calcio total y de calcio iónico en el plasma de los animales de la misma edad del grupo control. Los valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de las ratas SHR alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio que se habían tratado con amlodipino, fueron sólo ligeramente mayores que los correspondientes valores de calcio total y calcio iónico, obtenidos en el plasma de los animales de la misma edad del grupo control.

En la **tabla 22R** (página 159), figuran los valores de la calcemia obtenidos en los cuatro grupos de ratas SHR, cuando los animales tenían 16 y 23 semanas de vida. En la **figura 20R** (página 160), se representan estos valores en histogramas.

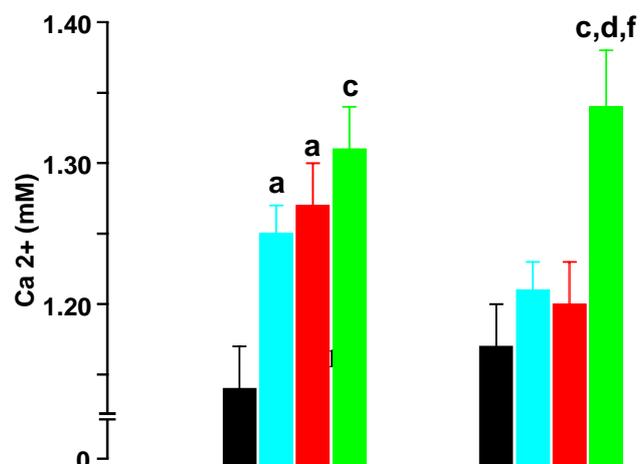
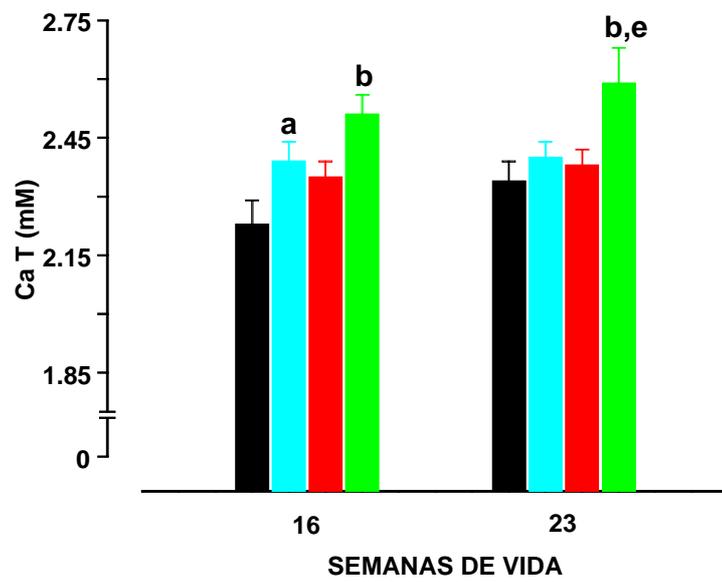


Figura 20R: Histogramas de los niveles plasmáticos de calcio total (Ca_T) y de calcio iónico (Ca^{2+}), de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (v), alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (v), alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (v), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (v). Los histogramas representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 12 muestras homogéneas. Las letras indican diferencias significativas entre los valores obtenidos en los animales de los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$ vs Ca 1%; ^d $p < 0.05$ vs Ca 2.5%; ^e $p < 0.01$; ^f $p < 0.01$ vs Ca 1% + amlodipino).

4.2.4.- Reactividad vascular de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico

En este estudio, la reactividad α vascular, al igual que la calcemia, se evaluó en las ratas SHR de 16 y 23 semanas de vida. Es decir, en los momentos de la vida en los que se habían observado cambios relevantes de la PA en los distintos grupos de ratas. Comentaremos en primer lugar el efecto que tuvo la destrucción del SNC sobre la PAS y la PAD de las ratas de los distintos grupos, y expondremos a continuación los resultados obtenidos en ellas cuando se administraban los agonistas α después de montar la preparación de "pithed rat".

Del mismo modo que sucedía en el estudio nº 1, cuando se destruyó el SNC de las ratas SHR de este estudio, se produjo también una brusca caída de la PA, reduciéndose mucho los niveles de la PAS y de la PAD de estos animales. La disminución de la PAS y de la PAD, producida al destruir el SNC, fue sin embargo algo distinta en las ratas de los distintos grupos. De hecho, la dieta enriquecida en calcio condicionó que esta disminución fuese algo mayor en los animales de más edad, y el tratamiento con amlodipino condicionó que esta disminución fuese algo menor en todos los animales, revirtiendo en parte el efecto de la dieta enriquecida en calcio en los de más edad.

En la **tabla 23R** (página 162), figuran los valores de la PAS y de la PAD, obtenidos después de destruir el SNC en los cuatro grupos de ratas SHR, cuando los animales tenían 16

y 23 semanas de vida. En la **figura 21R** (página163), se representan estos valores en histogramas. Aunque en esta tabla y en esta figura puede constatarse que la diferencia en la caída no fue en ningún caso significativa, puede observarse que cuando los animales tenían 16 semanas de vida, el nivel de PAS y de PAD después de destruir el SNC, era incluso algo mayor en el grupo de ratas alimentado con la dieta enriquecida en calcio. Por el contrario, cuando los animales tenían 23 semanas de vida, el nivel de PAS y de PAD después de destruir el SNC, fue menor en el grupo de ratas alimentado con esta dieta. Puede también observarse que cuando los animales tenían 16 semanas de vida, la PAD de los grupos tratados con amlodipino era ligeramente mayor que la PAD del grupo control (grupo alimentado con la dieta de contenido normal en calcio que no se trataba farmacológicamente). Así mismo, pudimos apreciar que cuando se destruía el SNC, de los animales de los grupos tratados con amlodipino que tenían 23 semanas de vida, los valores de la PAS, y también de la PAD, eran mayores que los de los animales de los grupos no tratados farmacológicamente.

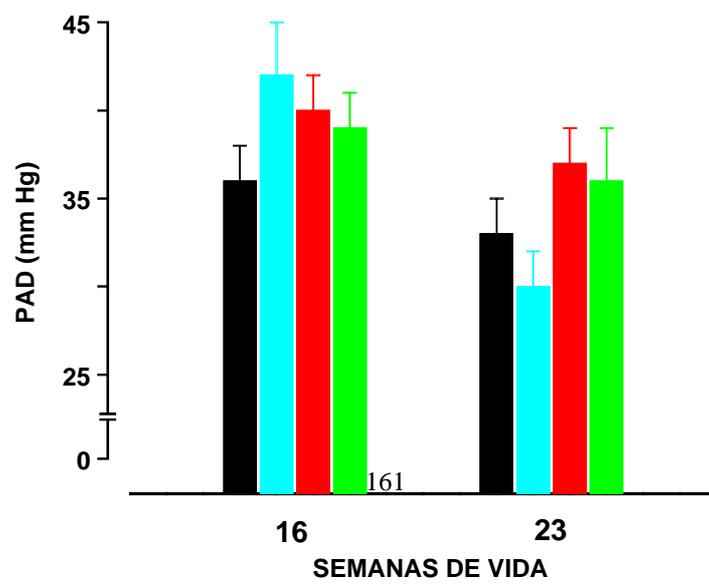
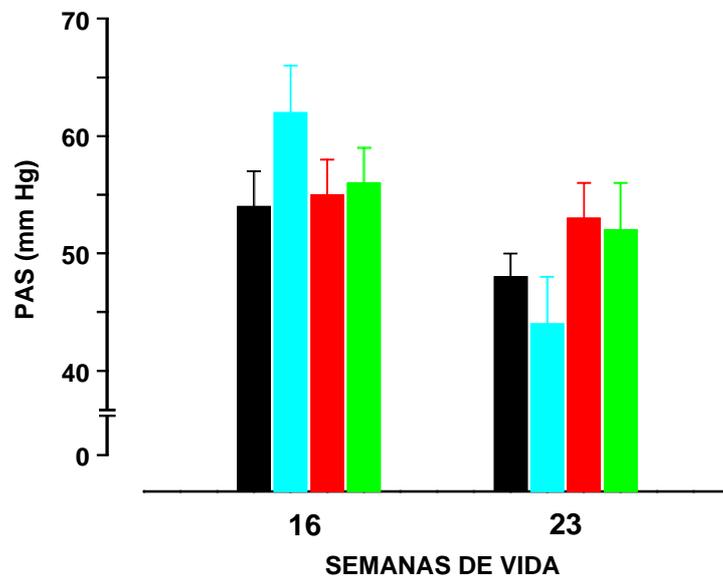


Figura 21R: Histogramas de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), después de destruir el sistema nervioso central, de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (v), alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (v), alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (v), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (v). Los histogramas representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Nunca existió diferencia significativa cuando se compararon los valores obtenidos en los animales de los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

La administración de los agonistas α , metoxamina y B-HT 920, ocasionó incrementos presores dosis dependientes en las ratas SHR descerebradas y desmeduladas de este estudio. Pudimos apreciar modificaciones de estas respuestas cuando aumentaba la ingesta de calcio en los animales, y así mismo también pudimos apreciar que estas respuestas se modificaban en los animales que se habían tratado con el antagonista del calcio amlodipino. Indicaremos más adelante estas modificaciones, pero queremos antes exponer el efecto que tenían los agonistas α en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban animales de distintas edades del grupo control.

Cabe recordar que en el estudio nº 1, las respuestas presoras del agonista α_1 , metoxamina, en la preparación de "pithed rat", eran mayores en los animales del grupo control que tenían más edad. En este estudio, por el contrario, no pudimos apreciar un incremento claro de las respuestas presoras de metoxamina en la preparación de "pithed rat", al aumentar la edad de los animales del grupo control (alimentado con la dieta de contenido normal en calcio y no tratado farmacológicamente). Las respuestas presoras de este agonista, y especialmente los incrementos de la PAS que producía en dicha preparación, fueron en realidad semejantes cuando los animales del grupo control tenían 16 semanas de vida, y cuando los animales de este grupo tenían 23 semanas de vida.

Cabe también recordar que en el estudio nº 1, las respuestas presoras del agonista α_2 , B-HT 920, en la preparación de "pithed rat", eran muy parecidas en los animales del grupo control de distintas edades. En este estudio, las respuestas de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", fueron algo menores en las ratas SHR del grupo control que tenían 23 semanas de vida, que en las ratas SHR del grupo control que tenían 16 semanas de vida. Pero de todos modos las respuestas de este agonista fueron también bastante parecidas en estos dos grupos

de animales. En las **tablas 24R y 25R** (página 165), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD, producidos por metoxamina y B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, cuando se utilizaban ratas SHR de 16 y 23 semanas de vida del grupo control. En la **figura 22R** (página 166), se representan las correspondientes curvas dosis-respuesta de estos agonistas obtenidas en estos animales. No existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista, en animales de 16 semanas de vida, y las correspondientes AUC del mismo agonista en animales de 23 semanas de vida.

Al igual que sucedía en el estudio nº 1, la administración de la dieta enriquecida en calcio ocasionó una disminución de las respuestas presoras de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", pero esta disminución pudo apreciarse únicamente en las ratas SHR de más edad. El tratamiento con amlodipino ocasionó por el contrario un ligero incremento de las respuestas presoras de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", y revirtió en parte el efecto que tenía la dieta enriquecida en calcio en las ratas SHR de más edad. Expondremos a continuación más detalladamente los resultados obtenidos con los agonistas α en la preparación de "pithed rat", cuando utilizábamos las ratas SHR de los distintos grupos.

Compararemos primero las respuestas presoras de los agonistas α en los animales de 16 semanas de vida de los cuatro grupos. Pudimos comprobar que las respuestas presoras de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", fueron en realidad semejantes en las ratas SHR de 16 semanas de vida de los cuatro grupos. Únicamente cabe señalar que en este momento de la vida, ambos agonistas ocasionaban usualmente respuestas presoras algo mayores cuando se utilizaban ratas alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio tratadas además con amlodipino. En las **tablas 26R y 27R** (página 168), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD, producidos por metoxamina y por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban las ratas SHR de 16 semanas de vida de los cuatro grupos establecidos para este estudio. En las **figuras 23R y 24R** (páginas 169 y 170), se representan respectivamente las correspondientes curvas dosis-respuesta de los dos agonistas obtenidas en estos animales. Puede observarse que en este momento de la vida, no existió nunca diferencia significativa, cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista, con las correspondientes AUC del mismo agonista en los restantes grupos.

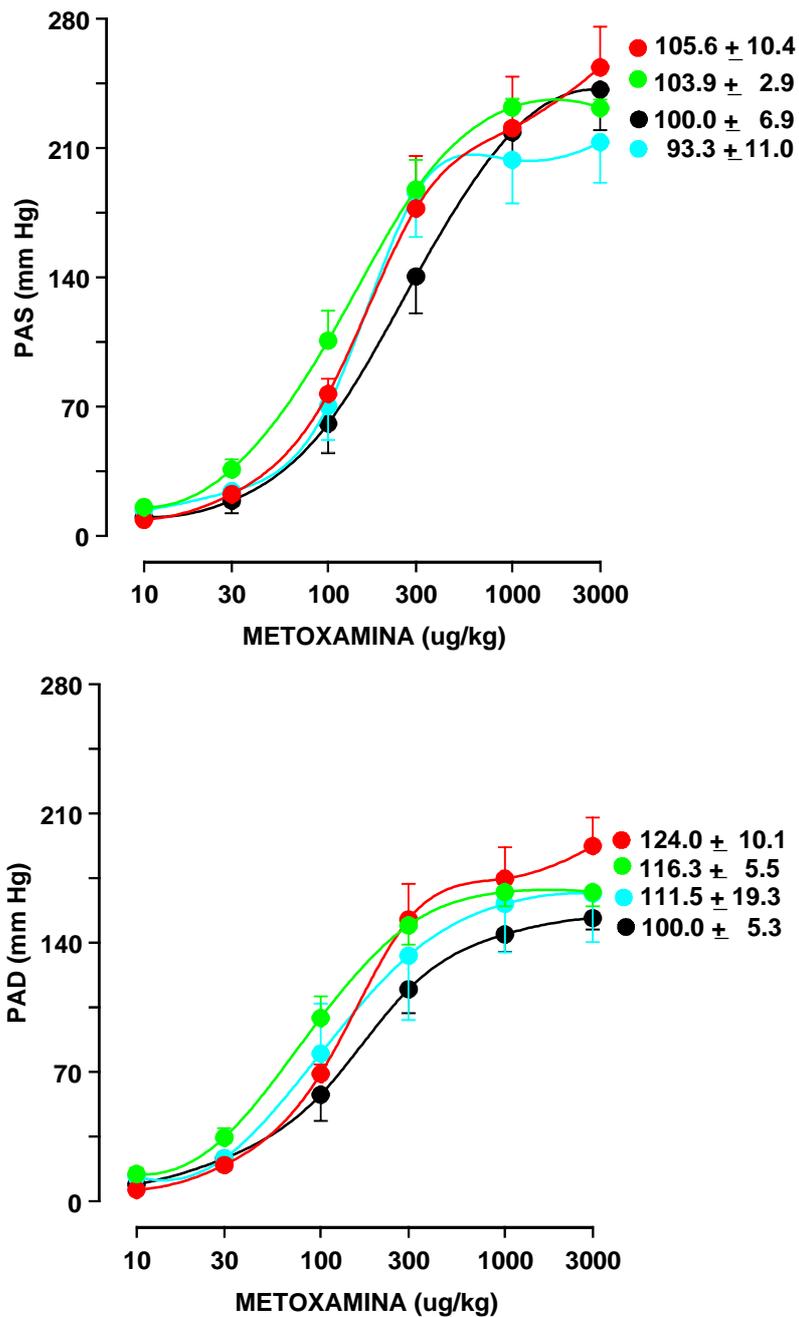


Figura 23R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando de ratas espontáneamente hipertensas de 16

semanas de vida de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ); alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ); alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ) y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas (AUC) normalizadas. Nunca existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC obtenidas en los animales de los distintos grupos utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

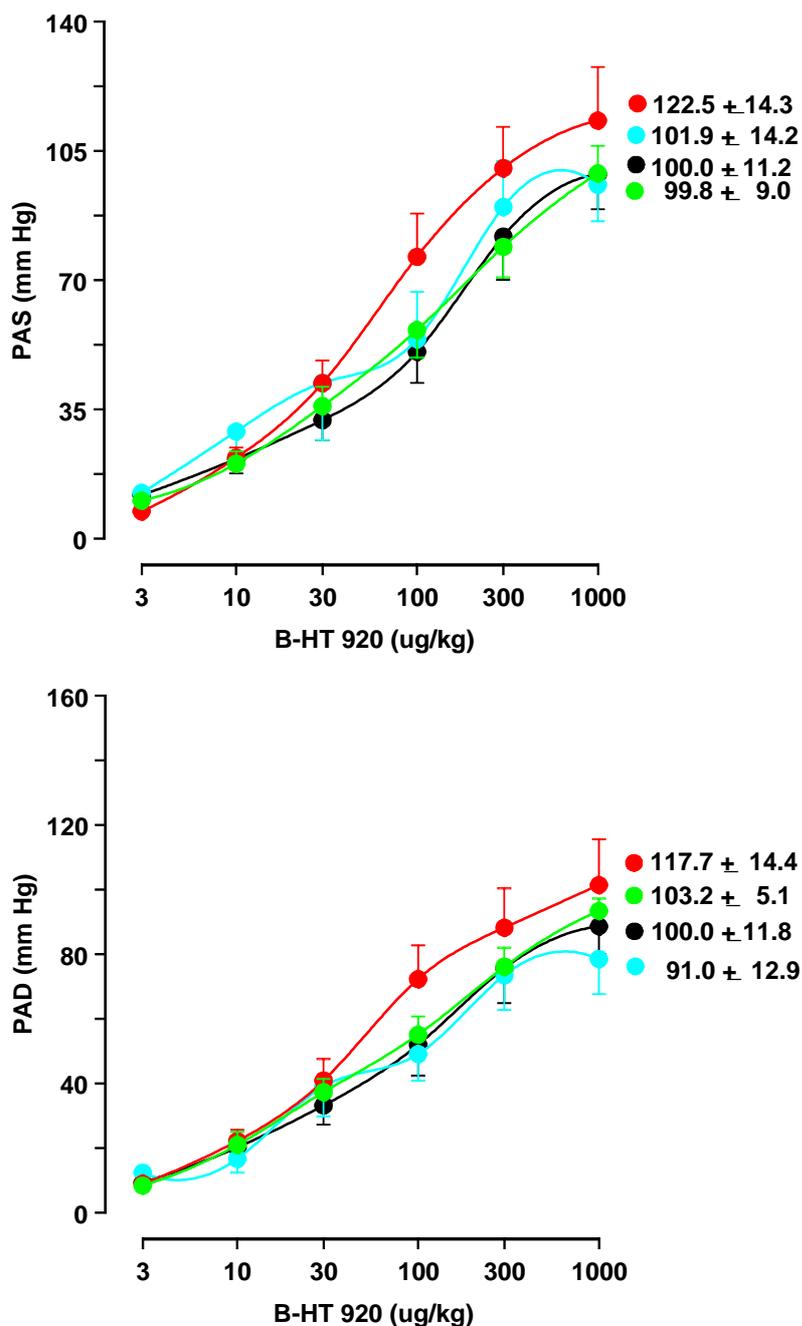


Figura 24R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 semanas de vida de distintos grupos. alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ);

alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ); alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ) y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino(λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas (AUC) normalizadas. Nunca existió diferencia significativa cuando se compararon las AUC obtenidas en los animales de los distintos grupos utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

Compararemos ahora las respuestas presoras de los agonistas α en los animales de 23 semanas de vida de los cuatro grupos. Pudimos comprobar que las respuestas presoras de metoxamina y B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", fueron mucho menores cuando se utilizaban ratas SHR de 23 semanas de vida, que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y que no se habían tratado farmacológicamente, que cuando se utilizaban ratas SHR del grupo control. Al igual que sucedía en los animales que tenían 16 semanas de vida, en los que tenían 23 semanas de vida, el tratamiento con amlodipino no llegó tampoco a modificar significativamente las respuestas que ocasionaban metoxamina y B-HT 920 en la preparación de "pithed rat". Las respuestas presoras de estos agonistas en la citada preparación, fueron sin embargo ligeramente mayores cuando se utilizaban ratas SHR de 23 semanas de vida alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio que se habían tratado con amlodipino, que cuando se utilizaban ratas SHR de la misma edad del grupo control. Cuando se utilizaban ratas SHR de 23 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, que se habían tratado además con amlodipino, las respuestas presoras de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", fueron también menores que las respuestas correspondientes de estos agonistas en la citada preparación, cuando se utilizaban ratas de la misma edad del grupo control. Sin embargo, como ya dijimos anteriormente, el tratamiento con amlodipino revirtió parcialmente el efecto de la dieta enriquecida en calcio sobre la reactividad α , y de hecho en este momento de la vida, las respuestas presoras de ambos agonistas en la preparación de "pithed rat", fueron mayores cuando se utilizaban animales que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio y se habían tratado con amlodipino, que cuando se utilizaban animales alimentados con esta dieta que no habían recibido tratamiento farmacológico. Las respuestas de estos fármacos en la preparación de "pithed rat", fueron por lo tanto más parecidas cuando se utilizaban animales del grupo control y animales del grupo tratado conjuntamente con la dieta enriquecida en calcio y amlodipino, que cuando se utilizaban animales del grupo control y animales del grupo tratado únicamente con la dieta enriquecida en calcio.

En las **tablas 28R y 29R** (página 173), figuran respectivamente los incrementos de la PAS y de la PAD, producidos por metoxamina y por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", cuando se utilizaban las ratas SHR de 23 semanas de vida de los cuatro grupos establecidos

para este estudio. En las **figuras 25R y 26R** (páginas 174 y 175), se representan respectivamente las correspondientes curvas dosis-respuesta de los dos agonistas obtenidas en estos animales. Pudo observarse que había diferencia significativa, cuando se comparaban las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista en ratas SHR de 23 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, y no tratadas farmacológicamente, y las correspondientes AUC del mismo agonista en ratas SHR de la misma edad del grupo control ($p < 0.01$). No existió sin embargo diferencia significativa, cuando se comparaban las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista en ratas SHR de 23 semanas de vida alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, y tratadas con amlodipino, y las correspondientes AUC del mismo agonista en ratas de la misma edad del grupo control. No existió tampoco diferencia significativa, cuando se compararon las AUC del incremento de PAS y de PAD de un agonista en ratas SHR de 23 semanas de vida, que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y se habían tratado con amlodipino, y las correspondientes AUC del mismo agonista en ratas SHR de la misma edad del grupo control.

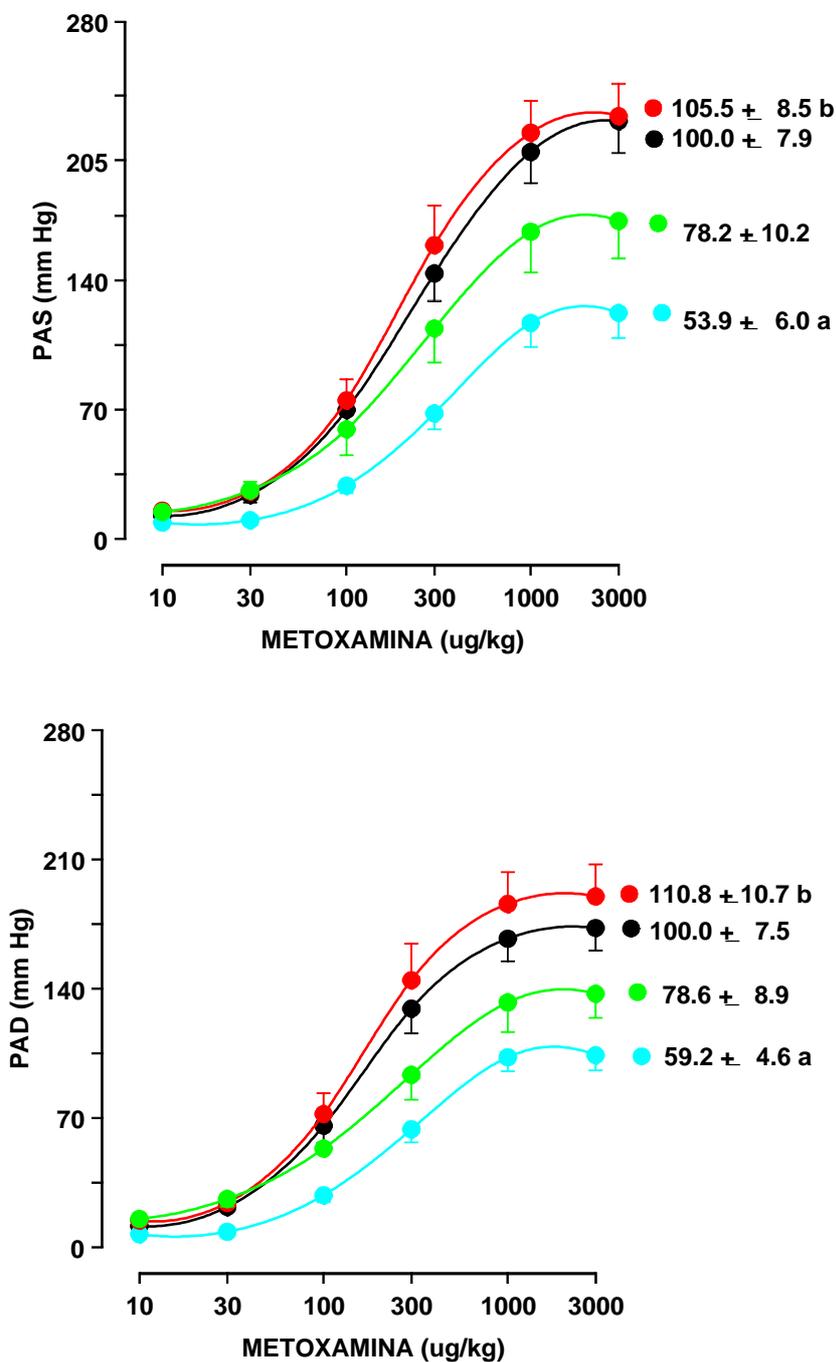


Figura 25R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por metoxamina en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 23 semanas de vida de distintos grupos. alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ); alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ); alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Las letras indican diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales de

los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^a $p < 0.01$ vs Ca 1%; ^b $p < 0.001$ vs Ca 2.5%).

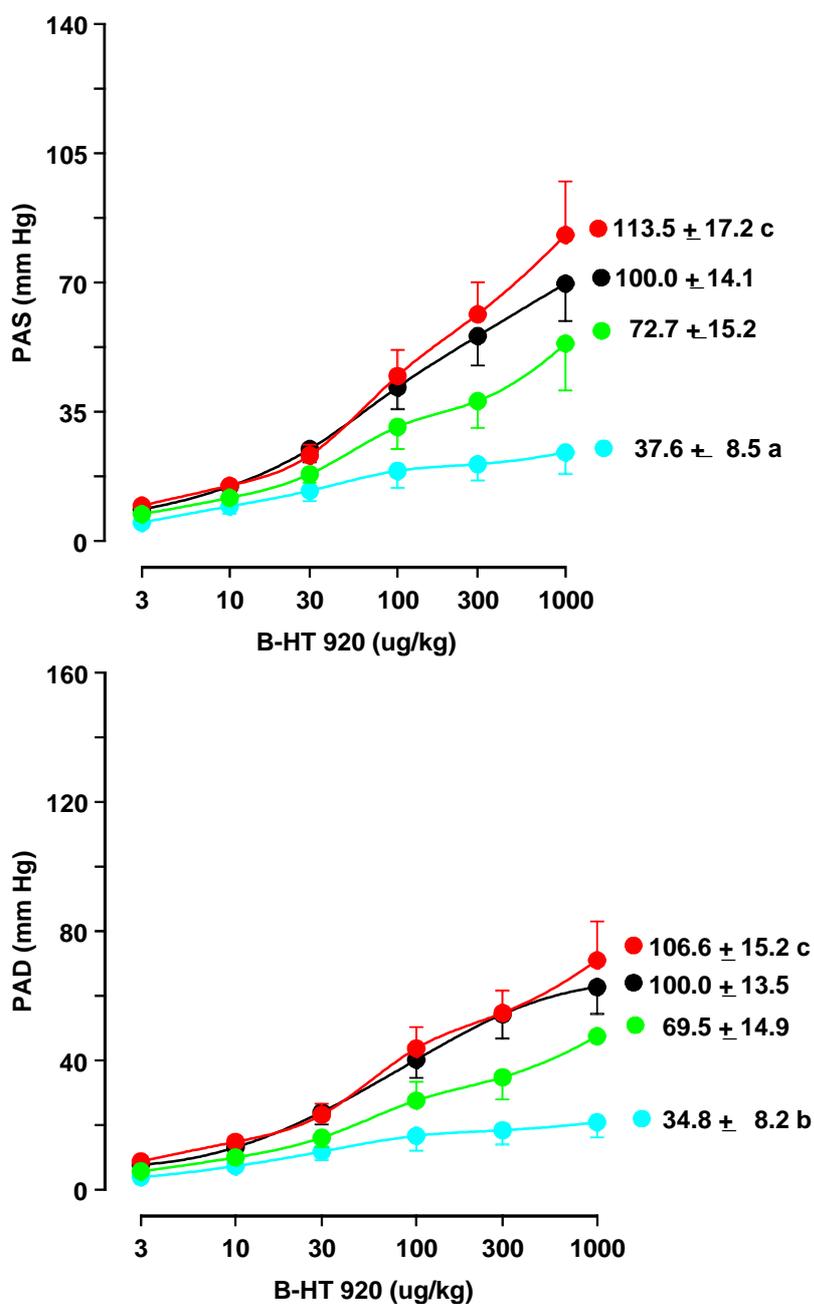


Figura 26R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 23 semanas de vida de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ); alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ); alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (λ). Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Las letras indican diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales de los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$ vs Ca 1%; ^c $p < 0.01$ vs Ca 2.5%).

5.- DISCUSSION

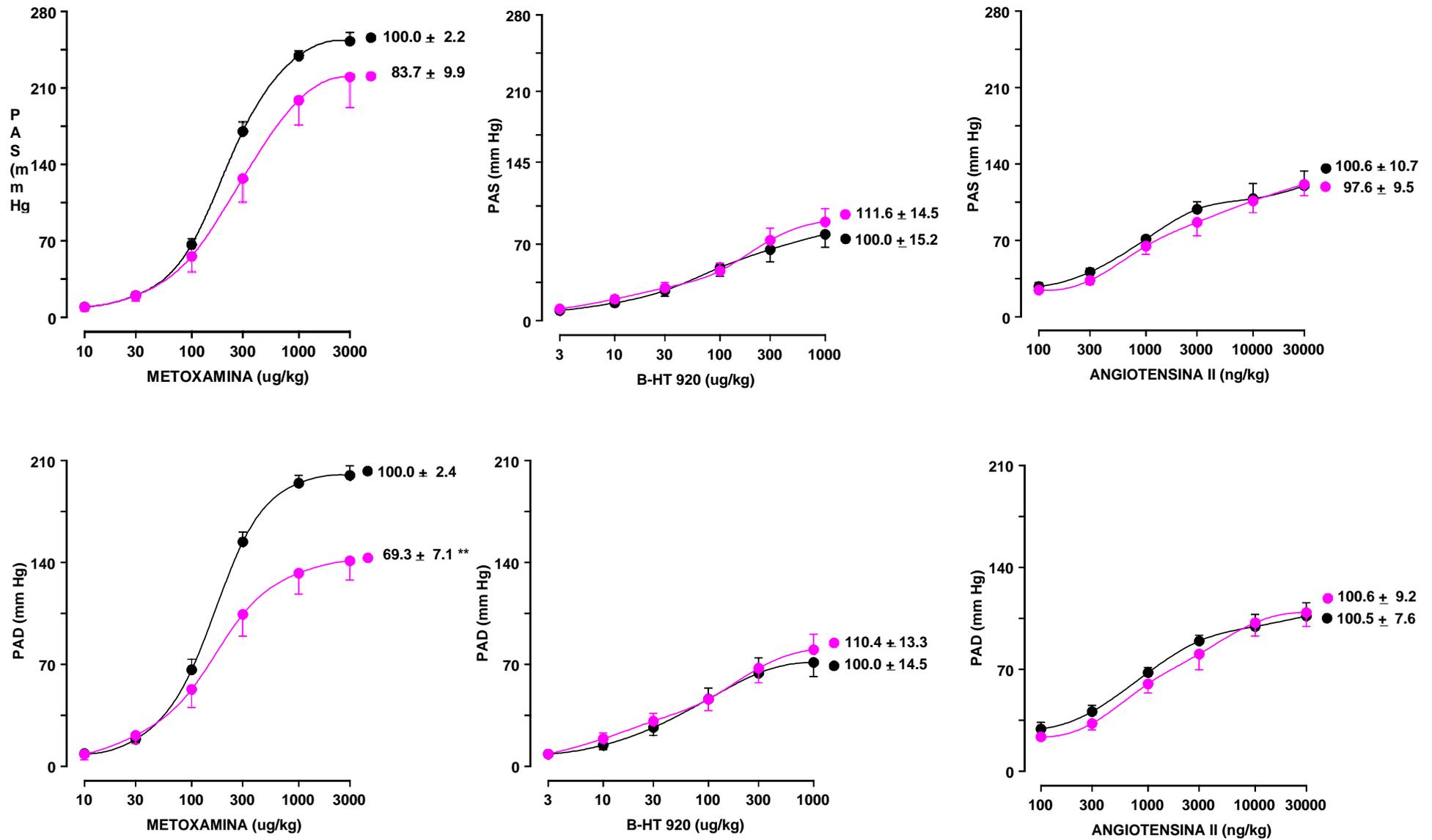


Figura 10R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por metoxamina, B-HT 920, y angiotensina II, en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 15 (λ) y 20 (λ) semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta control de contenido normal en calcio. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha

representan las áreas bajo las curvas normalizadas. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en los animales de 20 semanas de vida, utilizando el test de la "t de Student" (**p<0.01).

Tabla 19R: Peso corporal (g) de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino, o no recibían tratamiento farmacológico.

SEMANAS DE VIDA	Ca 1%	Ca 2.5%	Ca 1% + Amlodipino	Ca 2.5% + Amlodipino
3	41 ± 2	42 ± 3	41 ± 2	42 ± 2
4	64 ± 2	61 ± 1	64 ± 2	64 ± 2
5	90 ± 3	98 ± 2 *	81 ± 2	103 ± 3 **
6	122 ± 3	137 ± 2 **	118 ± 3	147 ± 4 **
7	161 ± 3	188 ± 2 ***	159 ± 3	186 ± 4 **
8	194 ± 4	233 ± 3 ***	192 ± 4	213 ± 6
9	235 ± 6	263 ± 5 **	226 ± 4	237 ± 6
10	246 ± 5	289 ± 5 ***	247 ± 4	258 ± 6
11	267 ± 5	299 ± 6 ***	259 ± 4	270 ± 6
12	279 ± 5	306 ± 5 **	275 ± 3	286 ± 7
13	292 ± 7	326 ± 7 **	290 ± 3	303 ± 6
14	307 ± 8	342 ± 5 **	299 ± 4	305 ± 8
15	313 ± 8	351 ± 6 **	314 ± 4	321 ± 7
16	302 ± 9	362 ± 5 ***	319 ± 4	328 ± 8
17	314 ± 9	370 ± 5 ***	326 ± 5	337 ± 8
18	325 ± 10	371 ± 7 **	332 ± 6	342 ± 9
19	330 ± 10	383 ± 7 **	330 ± 6	332 ± 9
20	336 ± 10	382 ± 7 **	337 ± 6	355 ± 10
21	350 ± 14	370 ± 10	335 ± 6	357 ± 10
22	352 ± 12	374 ± 11	338 ± 6	356 ± 11
23	341 ± 10	383 ± 13 *	359 ± 8	355 ± 10
24	356 ± 11	384 ± 12	346 ± 7	363 ± 10
25	360 ± 12	396 ± 12	375 ± 9	366 ± 11

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para 10 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en animales alimentados con la dieta Ca 1% que no recibían tratamiento farmacológico, utilizando el test de la "t de Student" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

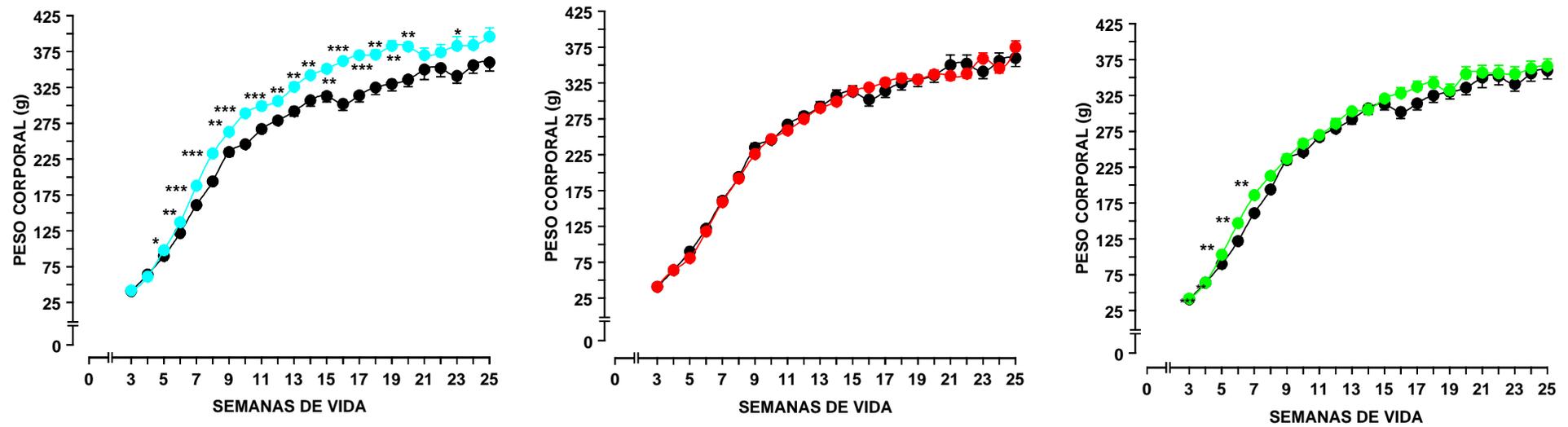


Figura 17R: Peso corporal de ratas espontáneamente hipertensas de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ) alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ), alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ), y alimentado con dieta enriquecida

en calcio y tratado con amlodipino (λ). Los datos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en animales alimentados con la dieta Ca 1% que no recibían tratamiento farmacológico, utilizando el test de la "t de Student" (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

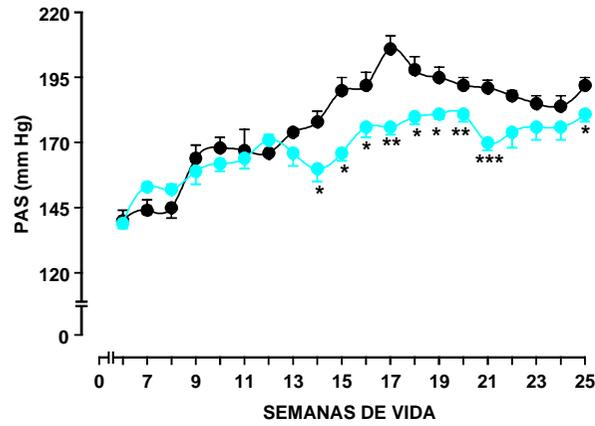
Tabla 20R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), y frecuencia cardíaca (latidos/minuto), de ratas espontáneamente hipertensas alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se trataban con amlodipino, o no recibían tratamiento farmacológico.

SEMANAS	Ca 1%			Ca 2.5%			Ca 1% + Amlodipino			Ca 2.5% + Amlodipino		
	PAS	PAD	Fc	PAS	PAD	Fc	PAS	PAD	Fc	PAS	PAD	Fc
6	140 \pm 4	98 \pm 3	420 \pm 18	139 \pm 2	100 \pm 3	464 \pm 8	135 \pm 3	90 \pm 5	401 \pm 14	146 \pm 3	113 \pm 5	446 \pm 10
7	144 \pm 4	101 \pm 3	422 \pm 15	153 \pm 1	110 \pm 3	440 \pm 9	142 \pm 3	94 \pm 5	390 \pm 10	146 \pm 3	113 \pm 5	444 \pm 11
8	145 \pm 4	106 \pm 5	405 \pm 15	152 \pm 2	116 \pm 2	420 \pm 12	144 \pm 3	98 \pm 5	399 \pm 12	148 \pm 4	106 \pm 8	428 \pm 5
9	164 \pm 5	125 \pm 5	415 \pm 13	159 \pm 5	118 \pm 2	444 \pm 10	153 \pm 5	114 \pm 4	440 \pm 14	162 \pm 3	129 \pm 1	422 \pm 7
10	168 \pm 4	127 \pm 4	420 \pm 13	162 \pm 3	120 \pm 4	444 \pm 8	169 \pm 8	127 \pm 9	428 \pm 22	168 \pm 3	133 \pm 3	409 \pm 11
11	167 \pm 8	127 \pm 8	439 \pm 13	164 \pm 4	118 \pm 4	451 \pm 8	165 \pm 5	121 \pm 3	444 \pm 13	172 \pm 5	123 \pm 6	449 \pm 12
12	166 \pm 1	126 \pm 1	433 \pm 18	171 \pm 2	128 \pm 2	414 \pm 12	161 \pm 4	120 \pm 2	448 \pm 12	174 \pm 4	132 \pm 6	458 \pm 7
13	174 \pm 1	136 \pm 4	422 \pm 15	166 \pm 5	129 \pm 4	427 \pm 10	171 \pm 2	131 \pm 2	462 \pm 19	157 \pm 4 **	119 \pm 5 *	474 \pm 10 *
14	178 \pm 4	134 \pm 3	419 \pm 10	160 \pm 5 *	121 \pm 5 *	422 \pm 6	180 \pm 5	131 \pm 3	440 \pm 12	162 \pm 2 **	124 \pm 2 *	472 \pm 6 **
15	190 \pm 5	143 \pm 5	418 \pm 16	166 \pm 3 *	122 \pm 2 *	440 \pm 6	187 \pm 5	138 \pm 8	420 \pm 12	160 \pm 4 **	123 \pm 3 *	469 \pm 11 *
16	192 \pm 5	144 \pm 5	412 \pm 16	176 \pm 4 *	134 \pm 4	418 \pm 6	185 \pm 7	139 \pm 7	416 \pm 21	156 \pm 4 ***	121 \pm 4 **	447 \pm 6
17	206 \pm 5	159 \pm 2	408 \pm 11	176 \pm 3 **	134 \pm 3 ***	421 \pm 6	187 \pm 5 *	141 \pm 8	437 \pm 21	159 \pm 6 ***	124 \pm 5 **	454 \pm 5 **
18	198 \pm 5	147 \pm 3	379 \pm 13	180 \pm 3 *	134 \pm 3 *	437 \pm 6 **	165 \pm 4 **	121 \pm 2 **	422 \pm 8 *	165 \pm 7 **	132 \pm 6 *	461 \pm 11 ***
19	195 \pm 4	147 \pm 4	406 \pm 14	181 \pm 2 *	140 \pm 3	428 \pm 5	171 \pm 3 ***	127 \pm 2 **	417 \pm 14	190 \pm 3	158 \pm 5	423 \pm 15
20	192 \pm 3	147 \pm 3	407 \pm 12	181 \pm 3 **	137 \pm 2 **	433 \pm 8	178 \pm 4 **	131 \pm 5 *	429 \pm 13	189 \pm 4	152 \pm 4	426 \pm 9
21	191 \pm 3	146 \pm 3	423 \pm 14	170 \pm 3 ***	131 \pm 5 *	460 \pm 14	172 \pm 5 **	129 \pm 5 *	400 \pm 12	193 \pm 6	156 \pm 6	448 \pm 12
22	188 \pm 2	149 \pm 2	418 \pm 11	174 \pm 6	135 \pm 5 *	464 \pm 13 *	175 \pm 6	136 \pm 6	435 \pm 18	189 \pm 7	155 \pm 9	449 \pm 10 *
23	185 \pm 3	146 \pm 3	403 \pm 13	176 \pm 5	129 \pm 6 *	464 \pm 11 **	175 \pm 5	133 \pm 5 *	436 \pm 14	190 \pm 3	152 \pm 3	451 \pm 11 *

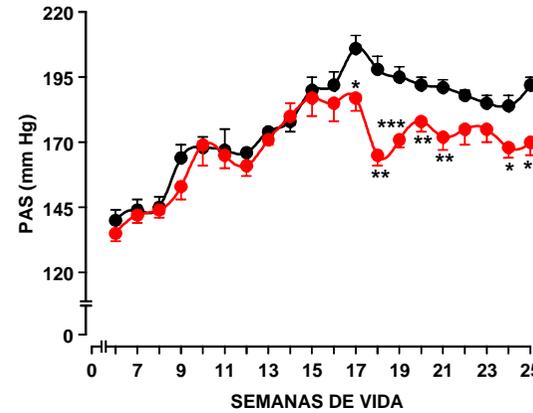
24	184 ± 4	142 ± 4	402 ± 11	176 ± 5	128 ± 5 *	456 ± 10 **	168 ± 4 *	130 ± 4 *	404 ± 8	195 ± 3	153 ± 4	450 ± 9 **
25	192 ± 3	151 ± 6	407 ± 18	181 ± 3 *	141 ± 3	439 ± 6	170 ± 5 **	130 ± 4 *	424 ± 6	197 ± 3	159 ± 5	443 ± 11

Los datos representan la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en animales alimentados con la dieta Ca 1% que no recibían tratamiento farmacológico, utilizando el test de la "t de Student" (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

A



B



C

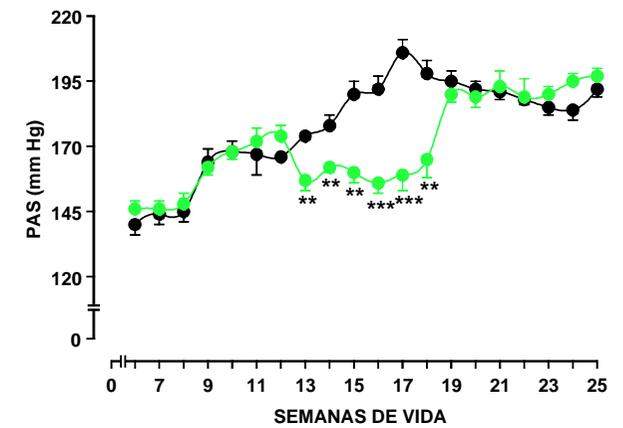
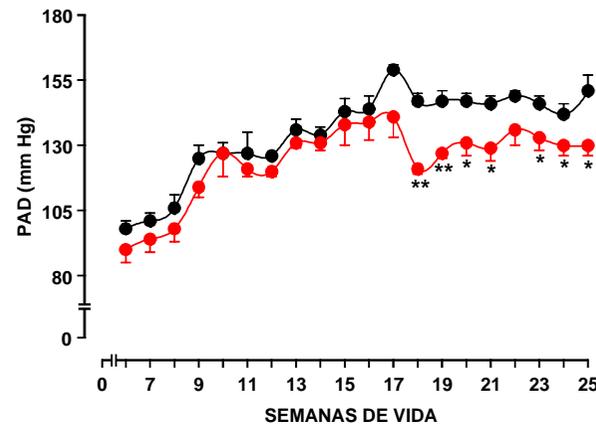
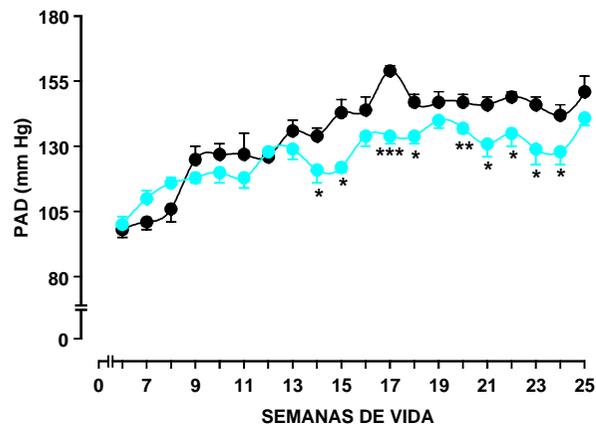
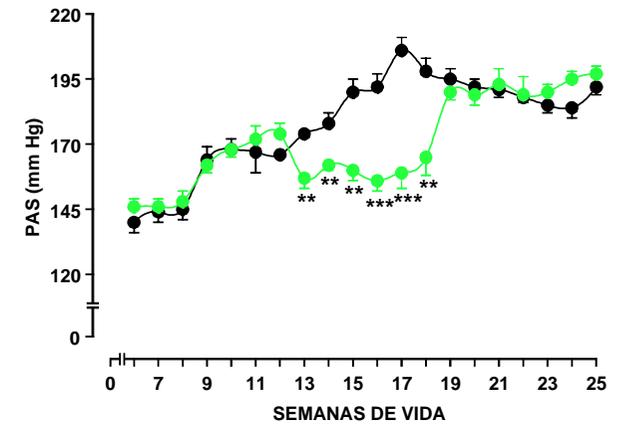


Figura 18R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), de ratas espontáneamente hipertensas de distintos grupos: alimentado con dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) (λ), alimentado con dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%) (λ), alimentado con dieta de contenido normal en calcio y tratado con amlodipino (λ), y alimentado con dieta enriquecida en calcio y tratado con amlodipino (λ). Los datos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los asteriscos indican diferencia significativa con los valores obtenidos en animales alimentados con la dieta Ca 1% que no recibían tratamiento farmacológico, utilizando el test de la "t de Student" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tabla 21R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mmHg), de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

	Ca 1%	Ca 2.5%	Ca 1%+ Amlodipino	Ca 2.5% + Amlodipino
16 semanas				
PAS	192 \pm 5	176 \pm 4	185 \pm 7	156 \pm 4 ^{b,c,e}
PAD	144 \pm 5	134 \pm 3	139 \pm 7	121 \pm 4 ^a
23 semanas				
PAS	185 \pm 3	176 \pm 5	175 \pm 5	190 \pm 3
PAD	146 \pm 3	129 \pm 6	133 \pm 5	152 \pm 3 ^{d,e}

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Las letras indican diferencias significativas entre los valores obtenidos en los distintos grupos utilizando, un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.001$ vs Ca 1%; ^c $p < 0.05$; ^d $p < 0.01$ vs Ca 2.5%; ^e $p < 0.01$ vs Ca 1% + amlodipino).

Tabla 22R: Niveles plasmáticos de calcio total (Ca_T) y de calcio iónico (Ca^{2+}), de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

	Ca 1%	Ca 2.5%	Ca 1% + Amlodipino	Ca 2.5% + Amlodipino
16 semanas				
Ca_T (mM); (mg/dl)	2.23 ± 0.06; 8.91 ± 0.25	2.39 ± 0.05; 9.57 ± 0.21 ^a	2.35 ± 0.04; 9.41 ± 0.16	2.51 ± 0.05; 10.05 ± 0.21 ^b
Ca^{2+} (mM); (mg/dl)	1.18 ± 0.03; 4.73 ± 0.12	1.24 ± 0.02; 4.95 ± 0.07	1.27 ± 0.03; 5.06 ± 0.10	1.31 ± 0.03; 5.22 ± 0.13 ^a
23 semanas				
Ca_T (mM); (mg/dl)	2.34 ± 0.05; 9.36 ± 0.18	2.40 ± 0.04; 9.58 ± 0.17	2.38 ± 0.04; 9.51 ± 0.16	2.59 ± 0.09; 10.36 ± 0.35 ^{b,e}
Ca^{2+} (mM); (mg/dl)	1.17 ± 0.03; 4.69 ± 0.10	1.21 ± 0.02; 4.83 ± 0.09	1.20 ± 0.03; 4.79 ± 0.12	1.34 ± 0.04; 5.37 ± 0.16 ^{c,d,f}

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 12 muestras homogéneas. Las letras indican diferencia significativa entre los valores obtenidos en los animales de los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001 vs Ca 1%; ^dp<0.05 vs Ca 2.5%; ^ep<0.05 ^fp<0.01 vs Ca 1% + Amlodipino).

Tabla 23R: Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), después de destruir el sistema nervioso central de ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida, alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

	Ca 1%	Ca 2.5%	Ca 1% + Amlodipino	Ca 2.5% + Amlodipino
16 semanas				
PAS	54 ± 3	62 ± 4	55 ± 3	56 ± 3
PAD	36 ± 2	42 ± 3	40 ± 2	39 ± 2
23 semanas				
PAS	48 ± 2	44 ± 4	53 ± 3	52 ± 4
PAD	33 ± 2	30 ± 2	37 ± 2	36 ± 3

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Nunca existió diferencia significativa cuando se compararon los valores obtenidos en los distintos grupos, utilizando un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

Tabla 24R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta de contenido normal en calcio, y todas ellas sin tratamiento farmacológico.

Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	16 semanas		23 semanas	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	10.2 \pm 3.7	9.1 \pm 4.7	12.6 \pm 2.2	11.5 \pm 2.2
30	19.1 \pm 6.8	23.2 \pm 6.2	24.0 \pm 4.2	21.9 \pm 3.6
100	60.8 \pm 16.0	57.7 \pm 14.1	69.9 \pm 11.3	65.8 \pm 9.3
300	140.5 \pm 20.0	114.8 \pm 13.0	143.8 \pm 15.0	129.2 \pm 13.3
1000	218.6 \pm 12.9	144.5 \pm 9.6	209.6 \pm 16.9	167.1 \pm 12.3
3000	241.6 \pm 21.9	153.3 \pm 6.1	226.3 \pm 17.4	172.9 \pm 12.2

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 25R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 y 23 semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta de contenido normal en calcio, y todas ellas sin tratamiento farmacológico.

Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	16 semanas		23 semanas	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
2	11.8 \pm 1.5	9.4 \pm 1.9	8.6 \pm 1.3	7.8 \pm 1.4
10	21.6 \pm 3.9	20.2 \pm 4.4	14.8 \pm 1.9	13.1 \pm 2.2
30	32.1 \pm 5.40	33.2 \pm 5.9	24.9 \pm 3.6	24.0 \pm 3.8
100	50.6 \pm 8.4	52.0 \pm 19.6	41.6 \pm 5.9	40.2 \pm 5.6

300	81.8 ± 11.7	75.6 ± 10.7	55.5 ± 8.0	54.3 ± 7.5
1000	98.6 ± 9.4	88.6 ± 8.5	69.7 ± 10.1	62.7 ± 8.3

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

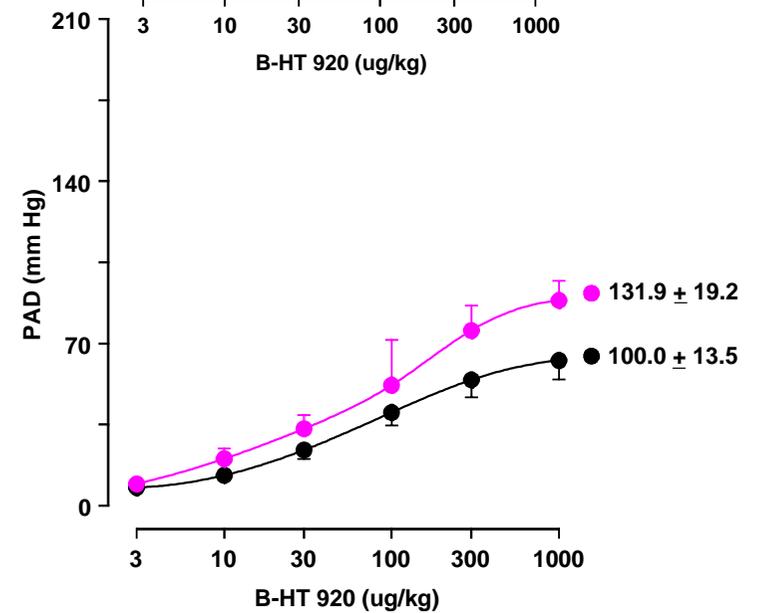
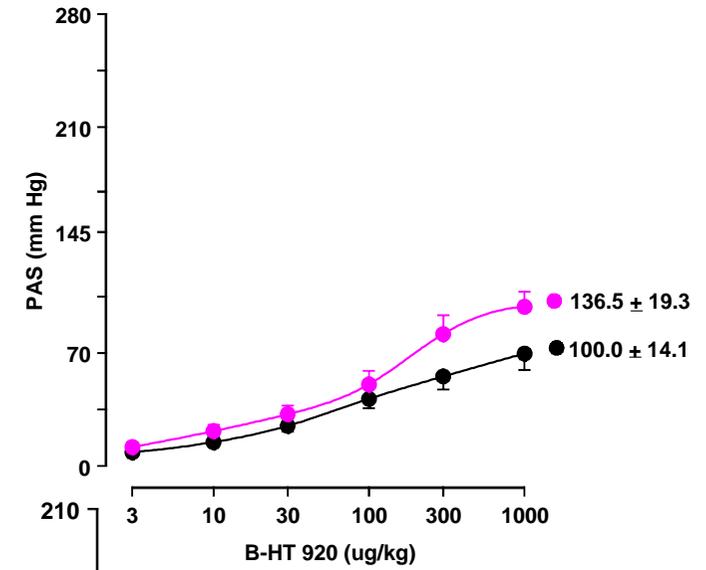
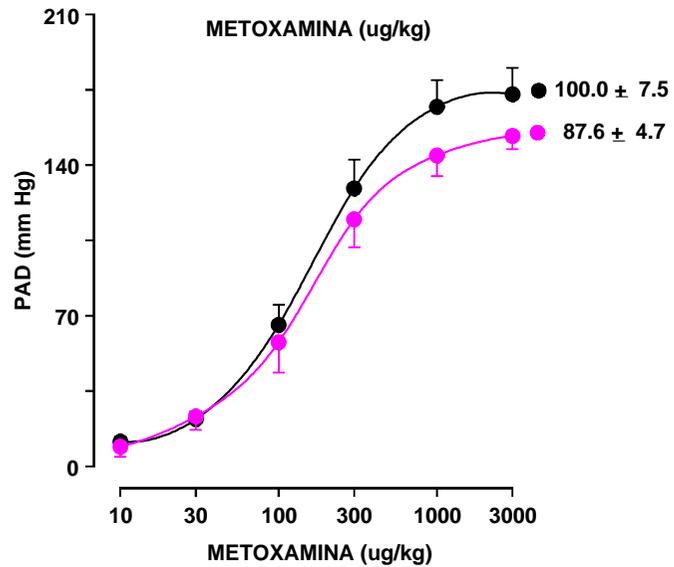
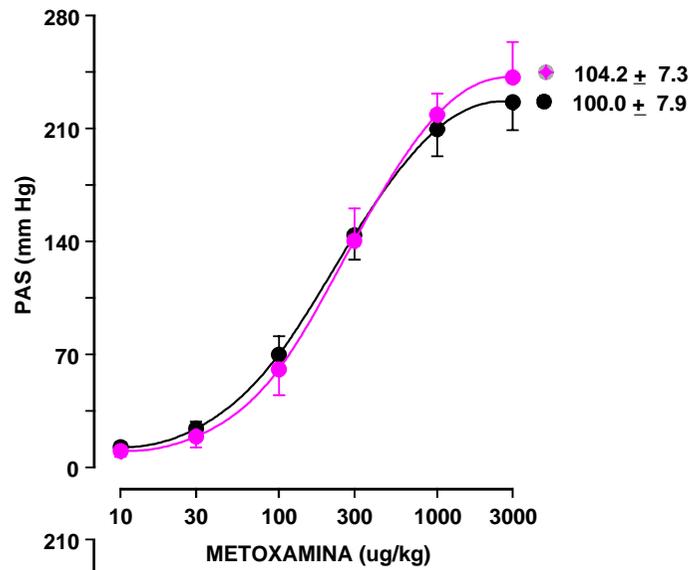


Figura 22R: Curvas dosis-respuesta logarítmicas de los incrementos de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), producidos por metoxamina y B-HT 920, en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 (λ) y 23 (λ) semanas de vida, alimentadas todas ellas con la dieta de contenido normal en calcio, y todas ellas sin tratamiento farmacológico. Los símbolos representan la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales. Los números que aparecen a la derecha representan las áreas bajo las curvas normalizadas. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos en animales de distintas edades, utilizando el test de la "t de Student".

Tabla 26R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

Dosis ($\mu\text{g/kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%		Ca 1% + Amlodipino		Ca 2.5% + Amlodipino	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	10.2 \pm 3.7	9.1 \pm 4.7	13.8 \pm 3.0	13.6 \pm 3.3	8.7 \pm 0.9	6.2 \pm 1.3	15.6 \pm 2.6	14.8 \pm 3.3
30	19.1 \pm 6.8	23.2 \pm 6.2	24.2 \pm 3.9	23.3 \pm 3.7	22.6 \pm 2.6	19.6 \pm 2.4	36.0 \pm 5.4	34.5 \pm 5.0
100	60.8 \pm 16.0	57.7 \pm 14.1	70.4 \pm 18.4	80.0 \pm 27.0	76.9 \pm 8.2	69.0 \pm 5.1	105.7 \pm 16.2	99.3 \pm 11.7
300	140.5 \pm 20.0	114.8 \pm 13.0	185.6 \pm 23.7	133.0 \pm 34.8	177.3 \pm 28.4	152.6 \pm 19.3	187.6 \pm 15.9	149.4 \pm 10.5
1000	218.6 \pm 12.9	144.5 \pm 9.6	203.6 \pm 23.6	161.0 \pm 26.2	220.8 \pm 27.8	174.7 \pm 16.9	238.0 \pm 5.6	167.4 \pm 7.67
3000	241.6 \pm 21.9	153.3 \pm 6.1	213.2 \pm 21.9	166.6 \pm 26.3	253.7 \pm 22.0	192.4 \pm 15.3	238.0 \pm 5.6	167.4 \pm 7.6

Cada valor representa la media \pm E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 27R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 16 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

Dosis ($\mu\text{g/kg}$)	Ca 1%		Ca 2.5%		Ca 1% + Amlodipino		Ca 2.5% + Amlodipino	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	11.8 \pm 1.5	9.4 \pm 1.9	12.4 \pm 3.3	12.4 \pm 3.3	7.4 \pm 1.3	9.0 \pm 0.9	10.3 \pm 1.4	8.4 \pm 11.0
10	21.6 \pm 3.9	20.2 \pm 4.4	29.0 \pm 9.5	16.7 \pm 4.3	21.9 \pm 2.8	22.2 \pm 3.5	20.3 \pm 3.3	21.0 \pm 4.0
30	32.1 \pm 5.40	33.2 \pm 5.9	42.2 \pm 15.5	39.1 \pm 9.3	42.1 \pm 6.1	40.9 \pm 6.7	35.9 \pm 5.2	37.3 \pm 4.1

100	50.6 ± 8.4	52.0 ± 19.6	54.0 ± 12.8	73.5 ± 0.8	76.3 ± 11.7	72.3 ± 10.4	56.5 ± 7.5	55.1 ± 5.6
300	81.8 ± 11.7	75.6 ± 10.7	89.8 ± 12.5	73.5 ± 10.8	100.3 ± 11.2	88.2 ± 12.2	79.0 ± 8.3	76.1 ± 5.9
1000	98.6 ± 9.4	88.6 ± 8.5	95.8 ± 9.9	78.5 ± 10.8	113.2 ± 14.5	101.4 ± 14.1	98.9 ± 7.4	93.4 ± 3.8

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 28R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por metoxamina en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 23 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

Dosis (µg/kg)	Ca 1%		Ca 2.5%		Ca 1% + Amlodipino		Ca 2.5% + Amlodipino	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
10	12.6 ± 2.2	11.5 ± 2.2	8.9 ± 2.4	7.1 ± 1.5	15.4 ± 1.7	14.5 ± 2.2	14.7 ± 2.3	15.4 ± 2.7
30	24.0 ± 4.2	21.9 ± 3.6	10.2 ± 1.9	8.4 ± 1.6	25.8 ± 2.2	24.1 ± 2.8	26.4 ± 4.5	26.2 ± 4.2
100	69.9 ± 11.3	65.8 ± 9.3	28.9 ± 4.0	28.2 ± 3.7	75.1 ± 11.4	72.2 ± 11.3	59.4 ± 14.0	53.5 ± 1.0
300	143.8 ± 15.0	129.2 ± 13.3	68.0 ± 8.6	63.9 ± 7.1	159.1 ± 21.3	144.6 ± 19.7	114.0 ± 18.5	93.4 ± 13.1
1000	209.6 ± 16.9	167.1 ± 12.3	117.0 ± 13.0	102.9 ± 7.6	225.5 ± 17.1	185.9 ± 17.3	166.4 ± 22.0	132.6 ± 16.1
3000	226.3 ± 17.4	172.9 ± 12.2	122.4 ± 13.6	104.0 ± 8.2	229.0 ± 17.4	190.0 ± 17.3	172.2 ± 20.3	137.3 ± 13.0

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

Tabla 29R: Incrementos de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) (mm Hg), producidos por B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", utilizando ratas espontáneamente hipertensas de 23 semanas de vida alimentadas con dos dietas de distinto contenido en calcio, que alternativamente se habían tratado con amlodipino, o no habían recibido tratamiento farmacológico.

Dosis (µg/kg)	Ca 1%		Ca 2.5%		Ca 1% + Amlodipino		Ca 2.5% + Amlodipino	
	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD	Δ PAS	Δ PAD
3	8.6 ± 1.3	7.8 ± 1.4	5.0 ± 1.2	3.9 ± 0.8	9.6 ± 0.7	8.8 ± 1.4	7.3 ± 0.6	5.7 ± 11.0
10	14.8 ± 1.9	13.1 ± 2.2	9.4 ± 2.0	7.3 ± 1.3	15.0 ± 1.0	14.8 ± 1.5	11.7 ± 1.0	10.0 ± 1.6
30	24.9 ± 3.6	24.0 ± 3.8	13.6 ± 2.8	11.8 ± 2.6	23.2 ± 2.9	23.2 ± 3.4	18.1 ± 2.3	16.1 ± 3.0

100	41.6 ± 5.9	40.2 ± 5.6	19.0 ± 4.6	16.7 ± 4.6	44.7 ± 7.0	43.7 ± 6.6	30.9 ± 6.0	27.6 ± 5.8
300	55.5 ± 8.0	54.3 ± 7.5	20.8 ± 4.4	18.4 ± 4.4	61.4 ± 8.7	54.7 ± 6.9	37.9 ± 7.3	34.8 ± 6.9
1000	69.7 ± 10.1	62.7 ± 8.3	24.0 ± 5.8	20.9 ± 4.7	82.9 ± 14.5	71.0 ± 12.0	53.5 ± 12.7	47.5 ± 1.3

Cada valor representa la media ± E.S.M. para un mínimo de 6 animales.

El concepto fundamental en el que hemos basado el desarrollo de esta Tesis Doctoral, es que el aumento del calcio extracelular causa paradójicamente una disminución de la contracción de las células del músculo liso vascular. Por este motivo, en muchos estudios experimentales y clínicos se han utilizado suplementos de calcio en la dieta para aumentar la calcemia y disminuir la PA de animales y pacientes hipertensos. Como indicamos en el apartado de **Antecedentes** (ver página 73 y referencias correspondientes), las investigaciones realizadas hasta este momento, señalan que los suplementos de calcio en la dieta modifican poco la PA de los sujetos normotensos, pero son capaces de controlar la PA de los sujetos hipertensos. Las dietas deficientes en calcio por el contrario pueden aumentar los niveles de PA .

Nuestro grupo de investigación también ha intentado evaluar las modificaciones de la PA en ratas alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio. Hace algunos años, caracterizamos el efecto de una dieta deficiente en calcio sobre la calcemia y la PA de ratas normotensas e hipertensas. Aquel estudio inicial con la dieta deficiente en calcio, nos servirá en ocasiones para interpretar mejor los resultados de la presente Tesis Doctoral. Esta Tesis Doctoral es en realidad una continuación de la línea de investigación que iniciamos hace años, para mejorar el conocimiento de los mecanismos que pueden justificar el efecto antihipertensivo de los suplementos dietéticos de calcio. En ella hemos abordado concretamente dos estudios experimentales. En el primero de estos estudios (estudio nº 1), hemos caracterizado las modificaciones de la calcemia, las modificaciones de la PA, y las modificaciones de la reactividad vascular, que aparecen en ratas normotensas e hipertensas, cuando estos animales se alimentan durante un período prolongado de tiempo con una dieta enriquecida en calcio. En el segundo estudio (estudio nº 2), hemos caracterizado estas modificaciones en ratas hipertensas alimentadas con la dieta enriquecida en calcio que se trataban además con amlodipino (antagonista del calcio de acción prolongada). Antes de discutir los resultados concretos obtenidos en estos dos estudios, haremos algunos comentarios sobre la metodología utilizada en esta Tesis Doctoral, y recordaremos algunas ideas que justificaron su planteamiento.

La mayoría de los estudios experimentales que han manipulado el contenido de calcio en la dieta de los animales, coinciden en afirmar que el contenido normal de calcio en estas dietas debe oscilar entre un 0.5 % y un 1%. La menor de estas cifras corresponde al nivel de calcio recomendado para ratas en el informe del Instituto Americano de Nutrición de 1976 (ver American Institute for Nutrition Ad Hoc Committee on Animal Nutrition, 1977). La mayoría de los piensos de rata contienen sin embargo un 1% de calcio. Nuestro grupo de investigación también considera

que la dieta de contenido normal en calcio debe tener un 1% de este elemento, y la dieta enriquecida en calcio utilizada en esta Tesis Doctoral tenía un 2.5% de calcio.

Para justificar las razas de animales utilizados en esta Tesis Doctoral, hay que señalar en primer lugar que los estudios de PA en animales hipertensos con dietas de distinto contenido en calcio, frecuentemente utilizan ratas SHR. Este modelo de HTA presenta unas características muy semejantes a las que presenta la HTA esencial en humanos. Como bien sabemos, el control normotenso de las ratas SHR son las ratas WKY. Sin embargo, los estudios experimentales de PA en los que se modifica el contenido dietético de calcio, en ocasiones utilizan otras razas de ratas normotensas. Hay varios motivos que justifican ésto. Hay que tener en cuenta que en estos estudios se intenta evaluar el efecto que tienen las distintas dietas sobre la PA en situaciones de HTA y en situaciones de normotensión, pero en ellos no se pretende por el contrario, establecer las diferencias concretas que existen entre las ratas SHR y su control normotenso. En su momento señalamos además en el apartado de Antecedentes (ver página **74**), que las ratas WKY tienen en realidad una condición genética que las predispone para desarrollar HTA. Wright y Rankin definieron por el contrario a las ratas SDR como una raza normotensa pura, y señalaron hace ya tiempo que eran más adecuadas que las ratas WKY para los estudios en los que se quiere controlar la PA de animales normotensos (Wright y Rankin, 1982). Por todos estos motivos, nuestro grupo de investigación utiliza siempre ratas SHR, y ratas SDR, para evaluar los efectos que tiene el calcio dietético sobre la PA de animales hipertensos y normotensos respectivamente. En esta Tesis Doctoral hemos utilizado también estos animales, y lógicamente no hemos llevado a cabo comparaciones estadísticas entre los resultados obtenidos en ambas razas.

Se han propuesto muchos mecanismos para justificar el efecto de los suplementos dietéticos de calcio sobre la PA. Distintos investigadores coinciden en afirmar que las dietas enriquecidas en calcio pueden disminuir los niveles de neurotransmisores y hormonas vasoconstrictoras. Muchos señalan también que estas dietas pueden aumentar la liberación endotelial de NO, o facilitar la extrusión de calcio en el miocito liso vascular. Todas estas alteraciones se comentaron más detalladamente en el apartado de **Antecedentes** (ver páginas **74-79** y referencias correspondientes). Llama sin embargo la atención, que hasta este momento, los datos que han aportado distintos investigadores sobre las alteraciones de la reactividad vascular que ocasionan los suplementos de calcio, son muy dispares. Los estudios en arterias aisladas de animales alimentados con dietas de distinto contenido en calcio, han resultado especialmente conflictivos y difíciles de interpretar porque sus resultados han sido muy variables. Algunos investigadores, y entre ellos el grupo de Hatton, prefirieron evaluar la reactividad vascular de las ratas alimentadas con dietas de distinto contenido en calcio,

midiendo las modificaciones de las respuestas presoras de NA y de angiotensina II en estos animales. Los trabajos del grupo de Hatton se han descrito en profundidad en el apartado de **Antecedentes** (ver páginas 79-81). Estos trabajos aportan también datos contradictorios, pero el de 1993 parece algo más concluyente (Hatton et al., 1993). En él se establece que los suplementos dietéticos de calcio disminuyen las respuestas de los receptores α_1 vasculares, y pueden por ello disminuir a su vez la PA. En el estudio nº 1 de esta Tesis Doctoral hemos querido básicamente corroborar y ampliar esta idea. Para ello, hemos llevado a cabo concretamente ensayos en la preparación de "pithed rat" con metoxamina (agonista α_1 selectivo), con B-HT 920 (agonista α_2 selectivo), y con angiotensina II (agonista que no estimula receptores α), y para todos estos ensayos hemos utilizado ratas SDR y ratas SHR que se habían alimentado alternativamente con la dieta de contenido normal en calcio (Ca 1%) o con la dieta enriquecida en calcio (Ca 2.5%). La utilidad de la preparación de "pithed rat" para evaluar respuestas α vasoconstrictoras se justificó en el apartado de **Antecedentes** (ver páginas **82-84**). Desde luego a nuestro juicio, los efectos presores en esta preparación deben reflejar mejor las modificaciones de la reactividad vascular, que las medidas de la PA realizadas por Hatton en animal entero.

El segundo estudio de esta Tesis Doctoral está basado principalmente en los resultados publicados por el grupo investigador de Pang en 1992 (Pang et al., 1992). Estos investigadores administraban tres dietas distintas durante 8 semanas a las ratas SHR. Administraban una dieta que podríamos considerar normal en calcio, ya que tenía un 0.8% de este elemento, y dos dietas deficientes en calcio que tenían menos de un 0.5% de este elemento. Los animales alimentados con cada dieta, recibían así mismo un tratamiento con nifedipino o verapamilo. Al finalizar el período de alimentación, se realizaba una medida puntual cruenta de la PA en los distintos grupos de ratas, y para ello se canulaba la arteria carótida de los animales. Hemos descrito en el apartado de **Antecedentes** estos estudios más detalladamente (ver páginas **84 y 85**). Sin embargo, lo que hay que resaltar aquí, es que con este estudio Pang et al., llegaron a la conclusión de que se requería una cantidad mínima de calcio en la dieta, para que los antagonistas del calcio controlasen de forma eficaz y predecible la PA de los animales. En base a estas observaciones, sugirieron que los antagonistas del calcio, podían presentar paradójicamente efectos sinérgicos con los suplementos dietéticos de calcio para el control de la PA en sujetos hipertensos. No existen sin embargo hasta este momento estudios que hayan evaluado la PA de sujetos hipertensos tratados conjuntamente con dietas enriquecidas en calcio y antagonistas del calcio. Tampoco conocemos estudios que hayan intentado averiguar los mecanismos que podrían justificar este posible sinergismo. En el segundo estudio de esta Tesis Doctoral, hemos intentado comprobar hasta qué punto los antagonistas del calcio son

más eficaces para el control de la PA en sujetos hipertensos, si se administran conjuntamente con dietas enriquecidas en calcio. Para ello, hemos medido la PA de cuatro grupos de ratas SHR durante un período largo de tiempo. Dos de estos grupos se alimentaban con la dieta de contenido normal en calcio y los otros dos se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, y uno de los dos grupos alimentados con cada dieta recibía además un tratamiento con amlodipino desde el momento del destete. En el segundo estudio de esta Tesis Doctoral hemos querido también caracterizar las alteraciones de la reactividad vascular que aparecen cuando se utilizan simultáneamente suplementos de calcio en la dieta y antagonistas del calcio. Hemos estudiado concretamente la posibilidad de que las modificaciones de la PA que aparecen cuando se administra una dieta enriquecida en calcio y un antagonista del calcio, sean debidas a la suma de los efectos que estos tratamientos tienen sobre las respuestas de los receptores α vasculares. Hay que tener en cuenta que la administración aguda de los antagonistas del calcio, se sabe desde hace tiempo que ocasiona una disminución de las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares. En realidad, en el apartado de Antecedentes (ver página **83**), señalamos que nuestro grupo de investigación, al igual que otros investigadores, comprobaron hace tiempo que los antagonistas del calcio ocasionaban una disminución muy marcada de las respuestas de los agonistas α_2 en la preparación de "pithed rat". Estos fármacos disminuían también las respuestas de los agonistas α_1 en esta preparación (Van Meel et al., 1981ab, Van Meel et al., 1982b; Timmermans et al., 1983; Ruffolo et al., 1984; Timmermans et al., 1987; Tabrizchi y Triggle, 1994; Aleixandre et al., 1995). Hasta este momento sin embargo, no se había estudiado la alteración de las respuestas α_1 y α_2 vasoconstrictoras después de administrar un antagonista del calcio durante un período prolongado de tiempo. Tampoco se habían evaluado hasta este momento las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares, después de un tratamiento crónico con un antagonista del calcio y una dieta enriquecida en calcio. Por todos estos motivos, en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral hemos incluido también experimentos con metoxamina y con B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", y estos experimentos se llevaron a cabo utilizando animales de los cuatro grupos establecidos.

En el apartado de **Metodología** únicamente hemos mencionado la dosis de amlodipino utilizada en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral. Creemos oportuno justificar aquí porqué administrábamos 1 mg/kg/día a las ratas de este estudio. En realidad la dosis del antagonista del calcio se eligió en base a un trabajo presentado anteriormente por nuestro grupo como comunicación a Congreso (López-Miranda et al., 1995). En aquella ocasión pudimos comprobar que la administración de amlodipino a las ratas SHR en el agua de bebida desde el momento del destete, ocasionaba en ellas una disminución de la PA dosis dependiente, y la dosis de 1 mg/kg/día ocasionaba concretamente una ligera disminución de la PA que

empezaba a manifestarse cuando estos animales alcanzaban las 11-12 semanas de vida. El efecto se mantenía desde entonces hasta que las ratas SHR tenían 20 semanas de vida. Esta dosis de amlodipino era por lo tanto capaz de disminuir la PA de las ratas SHR en la etapa de la vida en la que los niveles de la PAS y de la PAD de estos animales usualmente se estabilizan, pero no producía sin embargo en ellos una disminución llamativa de estas variables. La administración de 1 mg/kg/día de amlodipino podía por ello ser adecuada para el estudio de esta Tesis Doctoral en el que este fármaco debía utilizarse conjuntamente con los suplementos dietéticos de calcio.

Queremos señalar también que en los dos estudios de esta Tesis Doctoral hemos controlado siempre el desarrollo corporal de los distintos grupos de animales. Es obvio que la ingesta de una cantidad mayor de calcio puede alterar el desarrollo de los animales, y es importante dentro de nuestra línea de investigación, establecer si estas modificaciones en el desarrollo, pueden ser responsables en parte de las modificaciones que aparecen en la PA de las ratas. De hecho, como ya comentamos en el apartado de **Antecedentes**, distintos investigadores han estudiado también esta posibilidad (ver página 74 y referencias correspondientes).

Antes de entrar de lleno a discutir los resultados de esta Tesis Doctoral, queremos resaltar por último la diferencia metodológica en la forma de medir la PA que utilizábamos en los dos estudios realizados. En el primero se medía la PA aplicando el manguito en la cola de los animales conscientes (método del "tail cuff"). Resulta sin embargo bastante difícil obtener medidas fiables de la PA en ratas SHR conscientes con el "tail cuff". Por eso, en el segundo estudio, en el que únicamente utilizábamos animales de esta raza, creímos oportuno anestésiar a las ratas SHR ligeramente con éter dietílico antes de medir su PA con el manguito. Este procedimiento para medir la PA con el manguito en las ratas SHR superficialmente anestesiadas fue descrito por Dietz et al. en 1978 (Dietz et al., 1978). Es un método que facilita desde luego bastante su medida en los animales hipertensos, pero conlleva lógicamente el inconveniente de que el anestésico ocasiona siempre una ligera modificación de esta variable. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral, no podremos equiparar cuantitativamente las modificaciones de la PA obtenidas en los dos estudios realizados. En realidad, únicamente podremos confrontar desde un punto de vista cualitativo los resultados obtenidos en ambos estudios con la dieta enriquecida en calcio.

Hechas todas estas puntualizaciones, pasaremos a discutir los resultados concretos obtenidos en los dos estudios de esta Tesis Doctoral. Comenzaremos por comentar el efecto que tuvo la dieta enriquecida en calcio sobre la calcemia, la PA, el desarrollo, y la reactividad

vascular, de las ratas normotensas e hipertensas. Su efecto fue desde luego distinto en ambas razas. Recordemos que la administración de la dieta enriquecida en calcio ocasionó un aumento claro de la calcemia en las ratas normotensas (ver la **tabla 5R** de la página 117 y la **figura 5R** de la página 118). Esta dieta sin embargo, produjo sólo ligeras modificaciones de la PA en esta raza, y estas modificaciones sólo pudieron apreciarse antes de que los animales normotensos alcanzasen la edad adulta. Cuando las ratas SDR alcanzaban la madurez, es decir cuando tenían 9 semanas de vida, los niveles de la PA eran en realidad muy semejantes en el grupo alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y en el grupo alimentado con la dieta de contenido normal en calcio (ver la **tabla 3R** de la página 111 y la **figura 3R** de la página 112). Estos resultados corroboran las observaciones de otros investigadores, que establecieron también que los suplementos dietéticos de calcio no modifican, o modifican muy poco, los valores de la PA en sujetos normotensos (ver la información y las referencias correspondientes que figuran en la página 73 del apartado de **Antecedentes**).

Las medidas del peso corporal y de la longitud de la cola de las ratas SDR, que se reflejan en la **tabla 1R** y en la **figura 1R** de la página 107, y también en el texto de la página 106, indican que el incremento de calcio en la dieta tampoco modifica el desarrollo de estos animales. Los resultados obtenidos con metoxamina y con B-HT 920 en la preparación de "pithed rat", indican sin embargo, que cuando aumenta la ingesta de calcio se alteran las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares de las ratas normotensas. Ambos agonistas ocasionaron de hecho respuestas menores en esta preparación cuando las ratas SDR se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio (ver la **tabla 7R** y la **figura 7R** de las páginas 122 y 123, y ver así mismo la **tabla 8R** y la **figura 8R** de las páginas 124 y 125). Los niveles de la PAS y de la PAD que tenían las ratas SDR después de haber destruido su SNC, son así mismo una prueba de que cuando aumenta la ingesta de calcio, disminuye la respuesta de los receptores vasculares de estos animales. En el animal descerebrado, los valores de la PAS y de la PAD, reflejan el efecto que tienen las catecolaminas circulantes sobre los receptores α vasculares para mantener el tono arterial. Estos valores de la PAS y de la PAD eran siempre muy bajos cuando destruíamos el SNC de las ratas SDR, pero lo que merece la pena resaltar, es que cuando las ratas SDR que utilizábamos para montar la preparación de "pithed rat" se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, estos valores eran especialmente bajos (ver la **tabla 6R** de la página 120 y la **figura 6R** de la página 121). En base a todos estos resultados, hay que interpretar que la administración de suplementos dietéticos de calcio, ocasiona una disminución de las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares en los sujetos normotensos, pero en ellos deben existir mecanismos de contrarregulación para mantener la PA dentro de los límites normales que compensan esta modificación de la reactividad vascular. Los resultados de esta Tesis con angiotensina II en las

ratas SDR, indican que por el contrario los suplementos de calcio, no disminuyen la respuesta de otros receptores vasculares en los sujetos normotensos. Observamos que las respuestas de este agonista en la preparación de "pithed rat", eran incluso algo mayores cuando las ratas SDR se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio (ver la **tabla 9R** de la página 126 y la **figura 9R** de la página 127). Este incremento de las respuestas de angiotensina II, podría ser en realidad un mecanismo de adaptación, para que los animales normotensos alimentados con suplementos dietéticos de calcio que tienen menor respuesta α vasoconstrictora mantuviesen el tono arterial.

Los resultados más relevantes de esta Tesis Doctoral, son de todos modos, los que hemos obtenido cuando administrábamos la dieta enriquecida en calcio a las ratas hipertensas. Como bien sabemos, en el estudio nº 1 un grupo de ratas SHR se alimentó con esta dieta. En el estudio nº 2 existían dos grupos de ratas SHR que se alimentaban con ella, pero uno de ellos se trataba además con amlodipino. Los resultados obtenidos en el grupo de ratas del estudio nº 2 alimentado con la dieta enriquecida en calcio que no se trataba con el fármaco, se analizarán más adelante con los resultados obtenidos en los otros grupos de ratas de ese estudio, pero ahora se comentarán también conjuntamente con los resultados obtenidos en las ratas SHR del estudio nº 1 que igualmente se alimentaban con esa dieta y que tampoco se trataban farmacológicamente. Analizaremos por lo tanto a continuación los resultados obtenidos en todas las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio que no recibían ningún otro tratamiento. Veremos primeramente las alteraciones de la PA que ocasionó la dieta enriquecida en calcio en las ratas hipertensas, y comentaremos a continuación cómo se modificaba la calcemia y la reactividad vascular de estos animales.

Para estudiar el efecto de la dieta enriquecida en calcio sobre la PA de las ratas SHR, hay que tener en cuenta que el desarrollo de la HTA en estos animales permite definir dos fases distintas en su vida (Okamoto y Aoki, 1963; Smith y Hutchings, 1979; Karr-Dullien et al., 1981; Oktay et al., 1986; Sánchez et al., 1986; López-Miranda et al., 1998). En esta Tesis Doctoral, las medidas de la PAS y de la PAD de las ratas SHR conscientes, y así mismo las medidas de la PAS y de la PAD de las ratas SHR que se anestesiaban ligeramente con éter dietílico, han permitido también definir dos períodos distintos en la vida de estos animales. Nuestras medidas comenzaron cuando los animales tenían 6 semanas de vida. En este momento, las ratas SHR alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, presentaban ya valores de PAS y de PAD mucho más altos que los usuales en los animales normotensos. Es por ello previsible que estas ratas fuesen ya hipertensas antes de que nosotros comenzásemos a medir en ellas la PA. Es incluso posible que lo fuesen en el momento del destete, pero también es cierto que algunos investigadores han definido las primeras semanas

de la vida de las ratas SHR como una fase prehipertensa (Smith y Hutchings, 1979; Karr-Dullien et al., 1981; Sánchez et al., 1986). Así por ejemplo, Karr-Dullien y su equipo consiguieron medir la PA en ratas SHR recién nacidas, y en su estudio las ratas SHR de 2 semanas de vida presentaban valores de PA iguales a las de las ratas WKY de la misma edad. Con independencia de que pueda existir, o no existir, una fase de normotensión muy corta al comienzo de la vida de las ratas SHR, lo que parece claro, es que las modificaciones de la PA en el curso de la vida de estos animales, permiten establecer dos períodos distintos en los que el valor de esta variable es ya superior al normal. La fase o período inicial dura hasta que las ratas SHR tienen 11-12 semanas de vida. En esta fase la PA de las ratas es alta, pero además en ella se producen incrementos semanales llamativos de la PAS y de la PAD de los animales. En esta Tesis Doctoral estos incrementos se apreciaron claramente en las ratas SHR que se alimentaban con la dieta de contenido normal en calcio. La dieta enriquecida en calcio no modificó la PAD de las ratas SHR durante este período, pero ocasionó disminuciones de la PAS que pudieron apreciarse cuando medíamos esta variable en los animales conscientes (ver la **tabla 4R** de la página 114 y la **figura 4R** de la página 115). En las ratas SHR anestesiadas no se observaban estos cambios de la PAS que aparecían en las ratas SHR conscientes alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, pero es lógico que la anestesia con éter dietílico enmascare en parte las modificaciones de la PA que puede ocasionar esta dieta (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la **figura 18AR** de la página 154). En realidad ya hemos comentado que siempre que interpretemos los resultados de PA obtenidos en el estudio nº 2, se deberá tener en cuenta el efecto del anestésico. En cualquier caso, lo que interesa resaltar es que la dieta enriquecida en calcio sólo fue capaz de disminuir la PAS de las ratas SHR en esta primera etapa de su vida, y por el contrario no modificó en ella la PAD de los animales. Si seguimos analizando las medidas de la PA que obtuvimos en las ratas SHR, podemos ver que en ambos estudios, los niveles de la PAS y de la PAD de las ratas de esta raza que se alimentaban con la dieta de contenido normal en calcio, comenzaban a estabilizarse a partir de las 11-12 semanas de vida. Cuando las ratas SHR tienen esta edad comienza por lo tanto la fase en la que se estabiliza su PA. Como es lógico, será muy importante conocer como modifica la dieta enriquecida en calcio la PA de las ratas SHR durante este período de su vida. En el estudio nº 1, la PAS y la PAD se midió hasta que las ratas SHR tenían 20 semanas de vida. Cuando se programó este estudio consideramos en realidad que el margen de tiempo comprendido entre las 11-12 semanas de vida y las 20 semanas de vida, era suficiente para evaluar el efecto de los suplementos dietéticos de calcio sobre la PA de los animales hipertensos. En el estudio nº 1 comprobamos que la dieta enriquecida en calcio disminuía la PAS y la PAD de las ratas SHR durante este período (ver la **tabla 4R** de la página 114 y la **figura 4R** de la página 115). Esta disminución se apreciaba también cuando se medían estas variables en las ratas SHR anestesiadas del estudio nº 2 (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la

figura 18AR de la página 154). Es por lo tanto obvio que los suplementos dietéticos de calcio son capaces de controlar la PA de las ratas SHR cuando estos animales ya han consolidado y estabilizado su condición de hipertensos. Durante este período, en el que la PA de las ratas se mantenía estable, la dieta enriquecida en calcio también modificó más la PAS de los animales hipertensos que su PAD. Es importante resaltar esto, porque actualmente se piensa que el aumento de la PAS traduce la progresiva rigidez del sistema arterial. El aumento de la PAS es paralelo al aumento de la PP, y hoy día se considera que éste último es un excelente marcador y predictor de complicaciones cardiovasculares, tanto en pacientes normotensos como afectados de HTA. Observaciones recientes han constatado que la PP es mejor determinante del riesgo cardiovascular en ancianos que la PAS, la PAD o la PA media (De la Figuera M, 2001), y en realidad las medidas obtenidas en esta Tesis Doctoral en ratas SHR conscientes y anestesiadas también nos permiten decir que el calcio dietético disminuye la PP (ver texto de las páginas 113, 114 y 151 del apartado de **Resultados**).

El efecto de los suplementos dietéticos de calcio sobre la PA de las ratas SHR, se atenúa algo en las últimas semanas de tratamiento. Las mayores disminuciones de la PAS y de la PAD, se obtuvieron de hecho cuando los animales conscientes de esta raza tenían edades comprendidas entre 13 y 16 semanas de vida (ver la **tabla 4R** de la página 114 y la **figura 4R** de la página 115). Por este motivo, y en base a la hipótesis de esta Tesis Doctoral y a los objetivos que fijamos en ella, consideramos que era oportuno llevar a cabo determinaciones de calcemia y de reactividad vascular en las ratas SHR del estudio nº 1 cuando estos animales tenían 15 semanas de vida. En el estudio nº 1 se llevaron a cabo también estas determinaciones al finalizar el período de alimentación, es decir cuando los animales tenían 20 semanas de vida. Analizaremos a continuación los resultados obtenidos cuando determinábamos la calcemia y de la reactividad vascular de todos estos animales, y los analizaremos conjuntamente con los valores de la calcemia y la reactividad vascular de las ratas SHR del estudio nº 2 que tenían edades similares, y que igualmente recibían la dieta enriquecida en calcio como único tratamiento. Hay que advertir sin embargo, que el estudio nº 2 se prolongó hasta que las ratas SHR tenían 25 semanas de vida, y en base a los resultados de PA obtenidos en él, creímos preferible realizar las determinaciones de la calcemia y las evaluaciones de la reactividad vascular, cuando los animales tenían 16 y 23 semanas de vida, en vez de llevarlas a cabo cuando tenían 15 y 20 semanas de vida. Es decir, en este segundo estudio las citadas determinaciones se hicieron en ambos casos un poco más tarde que en el estudio nº1.

Lo primero que hay que señalar, es que los niveles plasmáticos de calcio total y de calcio iónico, eran siempre menores en las ratas SHR que en las ratas SDR. No hemos llevado

a cabo comparaciones estadísticas entre la calcemia de ambas razas porque no era éste nuestro objetivo, pero se pueden apreciar claramente estas diferencias si se observan los valores del calcio total y del calcio iónico de las ratas SHR y de las ratas SDR que aparecen en la **tabla 18R** de la página 140 y en **la figura 16R** de la página 141. Nuestro grupo de investigación ya había podido apreciar esta diferencia entre la calcemia de las ratas SHR y la calcemia de las ratas SDR en otros estudios anteriores (López-Miranda et al., 1998; Civantos et al., 1999). También Wright y Rankin pudieron comprobar hace tiempo que las ratas SDR tienen mayores niveles de calcio iónico extracelular que las ratas SHR (Wright y Rankin, 1982). Otros investigadores han comprobado así mismo que los niveles de calcio iónico en el plasma de las ratas SHR, son más bajos que los de su control genético normotenso las ratas WKY (McCarron et al., 1981; Stern et al., 1984; Bindels et al., 1987; Barbagallo et al., 1992; Wlodek ME et al., 2000). Del mismo modo, distintos investigadores han establecido que los pacientes hipertensos tienen usualmente niveles plasmáticos de calcio menores que los sujetos normotensos, y estos pacientes tienen por el contrario niveles intracelulares de calcio más altos (Resnick et al., 1983; Stern et al., 1984; Folsom et al., 1986; Bindels et al., 1987; Barbagallo et al., 1992; Young et al., 1992; Lind et al., 1993; Zhu et al., 1994; López-Jaramillo, 2000; Zozaya JL, 2000). Lógicamente ésto facilita el aumento del tono arterial que en ellos se aprecia. Los suplementos dietéticos de calcio corregirían la calcemia de los pacientes hipertensos, y como consecuencia de ello controlarían su PA. No serían eficaces por el contrario en los sujetos normotensos, que presentan ya niveles basales más altos de calcio plasmático. Estos razonamientos permiten justificar los valores de la calcemia y de la PA obtenidos en esta Tesis Doctoral en las ratas SHR que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, y permiten también justificar las diferencias entre los resultados obtenidos en ellas y los obtenidos en las ratas SDR alimentadas con esta dieta. Los valores de la calcemia y de la PA de las ratas SDR ya se han analizado, y hemos concluido que en los animales normotensos el aumento del calcio plasmático que produce el calcio dietético, no va acompañado de una modificación de la PA. Veremos ahora detalladamente la relación entre la calcemia y la PA de las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio.

Al igual que sucedía en las ratas SDR, la dieta enriquecida en calcio también ocasionó un aumento de la calcemia en las ratas SHR. Otros investigadores han podido comprobar también que las modificaciones del calcio dietético se acompañan de modificaciones del calcio plasmático en los animales hipertensos (McCarron et al., 1981; Stern et al., 1984; Furspan et al., 1989). El aumento del calcio plasmático en las ratas SHR que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, se apreciaba claramente cuando los animales tenían 15-16 semanas de vida. Cuando prolongábamos la alimentación con esta dieta, los valores de la calcemia de las ratas SHR descendían ligeramente, y al finalizar el período de alimentación volvían a ser algo

más parecidos a los de los animales de esta raza alimentados con la dieta de contenido normal en calcio (ver en el estudio nº 1 la **tabla 5R** de la página 117 y la **figura 5R** de la página 118, y ver así mismo en el estudio nº 2 la **tabla 22R** de la página 159 y la **figura 20R** de la página 160). Todo ello nos lleva a concluir, que los suplementos dietéticos de calcio producen un aumento de la calcemia, pero cuando se prolonga esta alimentación, los procesos de adaptación tienden a controlar este incremento del calcio plasmático. Lo que resulta sin embargo importante es que los suplementos dietéticos de calcio, además de producir un aumento llamativo de la calcemia en las ratas SHR de 15-16 semanas de vida, habían producido en ellas una marcada disminución de la PA, y el reajuste de la calcemia que se observaba al prolongar la alimentación con la dieta enriquecida en calcio, se podía observar también con la PA de los animales hipertensos. Es decir, las modificaciones de la calcemia producidas por la dieta enriquecida en calcio en los animales hipertensos, se acompañaron en todo momento de modificaciones paralelas en sus niveles de PA. Es por lo tanto evidente, que la medida del calcio plasmático, que en último término refleja la concentración de calcio iónico que existe en el medio extracelular, permite hasta cierto punto saber cómo se modifica la PA de los animales hipertensos cuando se administran suplementos dietéticos de calcio. Como veremos más adelante en esta Discusión, las medidas de la calcemia son en realidad un apoyo importante para interpretar estas modificaciones.

La importancia que tienen los niveles plasmáticos de calcio como valor predictivo de la PA podría tener también transcendencia clínica. Quizá en algunos casos podría resultar útil medir los niveles plasmáticos de calcio en los pacientes hipertensos. Sobre todo podría sugerirse su determinación en los hipertensos en los que se sospecha un déficit en la ingesta de calcio, ya que previsiblemente en ellos el nivel plasmático de calcio será especialmente bajo. Los suplementos de calcio corregirían esta situación, y de este modo controlarían la PA de los pacientes hipertensos, o bien facilitarían su control con alguna medida terapéutica adicional. La determinación más apropiada sería probablemente la del calcio iónico, que es la fracción plasmática activa. Algunos investigadores han descrito además, que la alteración en los niveles plasmáticos de calcio iónico, no está necesariamente asociada con una alteración de los niveles plasmáticos de calcio total. Se ha explicado esta discrepancia en base a las modificaciones que pueden existir en la unión del calcio a proteínas plasmáticas y proteínas de membrana (Navarro-López et al., 1980; Channick et al., 1981; Folsom et al., 1986; Strazullo et al., 1986; Young et al., 1992; Papagalanis et al., 1993).

El principal interés que tiene de todos modos para la hipótesis de esta Tesis Doctoral determinar la calcemia de las ratas, es saber si las modificaciones de este ión en el medio plasmático extracelular, pueden producir alteraciones en la respuesta de los receptores

vasculares, que justifiquen los cambios de la PA observados en los animales que reciben suplementos de calcio. En esta Tesis Doctoral hemos estudiado concretamente cómo se modificaban las respuestas de los receptores α , y las respuestas de los receptores de angiotensina II, en las ratas hipertensas en las que los suplementos de calcio habían aumentado la calcemia y habían corregido en parte los niveles de PA. Analizaremos a continuación los resultados de esta investigación.

Cuando llevamos a cabo ensayos con metoxamina y con B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, pudimos comprobar que las respuestas de estos agonistas eran muy parecidas en las ratas SHR de 15 semanas de vida alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, y en las ratas SHR de la misma edad alimentadas con la dieta enriquecida en calcio (ver la **tabla 13R** y la **figura 11R** de las páginas 133 y 134, y ver así mismo la **tabla 14R** y la **figura 12R** de las páginas 135 y 136, correspondientes todas ellas al estudio nº 1). Esto también sucedía cuando llevábamos a cabo ensayos semejantes con las ratas SHR de 16 semanas de vida (ver la **tabla 26R** y la **figura 23R** de las páginas 168 y 169, y ver así mismo la **tabla 27R** y la **figura 24R** de las páginas 168 y 170, correspondientes todas ellas al estudio nº 2). Sabemos sin embargo que las ratas SHR de 15-16 semanas de vida presentaban claras modificaciones en la calcemia y en la PA cuando se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio. Estos hechos indican que el aumento en la ingesta de calcio es capaz de disminuir la PA sin producir cambios en las respuestas de los receptores α vasculares. Es desde luego muy posible que otros mecanismos distintos de los cambios en la reactividad vascular, jueguen un papel importante en el control de la PA que ejercen los suplementos de calcio. Para interpretar correctamente los datos de la reactividad vascular de las ratas SHR de 15-16 semanas de vida, hay sin embargo que tener también en cuenta los resultados que obtuvimos cuando llevábamos a cabo ensayos con los agonistas α en la preparación de “pithed rat” utilizando animales de más edad. En primer lugar, hay que señalar que cuando administrábamos la dieta control, las respuestas de metoxamina en la preparación de “pithed rat”, no eran iguales en los animales más jóvenes y en los animales de más edad. Estos últimos mostraban incrementos presores mayores cuando se administraba este agonista (ver en el estudio nº 1 la **tabla 10R** de la página 129 y la **figura 10R** de la página 131, y ver así mismo en el estudio nº 2 la **tabla 24R** de la página 165 y la **figura 22R** de la página 166). Los datos obtenidos con metoxamina en animales de distinta edad alimentados con la dieta control, sugieren que los receptores α de las ratas SHR de 15-16 semanas de vida podían no haber completado su maduración. Es concretamente muy probable que las ratas SHR de esta edad tengan receptores α_1 inmaduros, que en este momento de la vida estén todavía aumentando su número o su sensibilidad a los agonistas. En base a esta idea, cabe pensar que los suplementos dietéticos de calcio no

modifiquen las respuestas de los agonistas α en las ratas SHR de 15-16 semanas de vida, porque los receptores α del tejido vascular de estos animales estén todavía alterando su capacidad de respuesta. Esta premisa está también avalada por los resultados de otros investigadores, que demostraron con ensayos de “binding” que la maduración de los receptores α en las ratas SHR tenía lugar de forma progresiva a lo largo de su vida. Así por ejemplo, Sánchez y su equipo en 1986 comprobaron que en el riñón de las ratas SHR, la población de los receptores α_1 aumentaba hasta que los animales tenían 8 semanas de vida, y los receptores α_2 aumentaban progresivamente hasta que los animales tenían 18 semanas de vida (Sánchez et al., 1986). Otkay y su equipo en 1986 también demostraron con estudios de “binding”, que los niveles de los receptores α_1 en las ratas SHR no podían considerarse estables hasta que los animales tenían 8 semanas de vida (Otkay et al., 1986). No conocemos estudios que hayan medido concretamente la densidad de los receptores α en el tejido arterial de ratas SHR de distintas edades. Hay que tener en cuenta que los estudios de “binding” en tejido vascular conllevan bastantes dificultades. Pueden lógicamente existir diferencias entre los cambios que van apareciendo con la edad en los receptores de distintos tejidos, pero en cualquier caso, los datos que hemos aportado sugieren que la densidad de los receptores α en el tejido arterial de las ratas SHR puede aumentar a lo largo de su vida. Es muy probable que la densidad de estos receptores sea distinta en los distintos momentos en los que nosotros hemos medido las respuestas de metoxamina y de B-HT 920, y tendremos lógicamente que tener ésto en cuenta para interpretar correctamente los resultados de reactividad vascular obtenidos en las ratas SHR alimentadas con las dos dietas. Antes de llegar a una conclusión definitiva, tendremos por lo tanto que analizar también el efecto de metoxamina y de B-HT 920 en las ratas SHR de más edad que se estaban alimentando con la dieta enriquecida en calcio.

Aunque la dieta enriquecida en calcio no había modificado las repuestas de los agonistas α en las ratas SHR de 15-16 semanas de vida, pudimos apreciar que los incrementos presores producidos por metoxamina y por B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, disminuían llamativamente en las ratas SHR de más edad que se habían alimentado con suplementos de calcio. Esta disminución de las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares producida por el calcio dietético, pudo apreciarse claramente en las ratas SHR de 20 semanas de vida del estudio nº 1 (ver la **tabla 16R** y la **figura 14R** de las páginas 139 y 140, y ver así mismo la **tabla 17R** y la **figura 15R** de las páginas 141 y 142), y pudo también apreciarse en las ratas SHR de 23 semanas de vida del estudio nº 2 (ver la **tabla 28R** y la **figura 25R** de las páginas 173 y 174, y ver así mismo la **tabla 29R** y la **figura 26R** de las páginas 173 y 175). Habrá por lo tanto que asumir que el incremento de calcio en la dieta, produce en realidad modificaciones de las respuestas de los receptores α vasculares en los animales hipertensos.

Estas modificaciones lógicamente podrían condicionar los cambios de la PA que en ellos se observan. Si intentamos relacionar los cambios de las respuestas de los receptores α vasculares de los animales hipertensos alimentados con suplementos de calcio, con los cambios en su PA, puede sin embargo sorprender que unos y otros se hayan apreciado en momentos distintos. En realidad, las respuestas de los agonistas α en las ratas SHR, disminuyeron sólo al finalizar el período de alimentación, que era cuando el efecto de la dieta enriquecida en calcio sobre la PA se había atenuado algo. Para interpretar estos datos habrá que tener en cuenta que al finalizar el período de alimentación, los mecanismos compensadores que intentan mantener el tono arterial pueden contrarrestar en parte el efecto del calcio sobre la PA, pero sin embargo, en ese momento los receptores α vasculares de los animales hipertensos habrán completado su maduración, y se podrá apreciar el efecto del calcio sobre su respuesta. No queremos pasar por alto además, que al igual que sucedía en las ratas SDR, los valores basales de la PAS y de la PAD de las ratas SHR después de destruir su SNC, permiten también afirmar que el calcio disminuye la respuesta α vasoconstrictora de los animales hipertensos. Estos valores de la PAS y de la PAD eran desde luego especialmente bajos en las ratas SHR que se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio, y ya sabemos que en los animales descerebrados el tono arterial se mantiene básicamente por el efecto que tienen las catecolaminas circulantes sobre los receptores vasculares (ver la **tabla 6R** y la **figura 6R** de las páginas 120 y 121, y ver así mismo la **tabla 23R** y la **figura 21R** de las páginas 162 y 163).

En lo que respecta a las respuestas de los receptores de angiotensina II, hay que indicar en primer lugar que la edad de las ratas SHR no condicionó los incrementos presores que producía este agonista en la preparación de "pithed rat" (ver la **tabla 12R** de la página 130 y la **figura 10R** de la página 131). No parece por lo tanto que la densidad, o la sensibilidad de estos receptores, cambie a lo largo de la vida de estos animales. Pudimos por otra parte comprobar que la dieta enriquecida en calcio aumentaba las respuestas de angiotensina II en las ratas SHR (ver la **tabla 15R** y la **figura 13R** de las páginas 137 y 138, y ver así mismo la **tabla 18R** y la **figura 16R** de las páginas 143 y 144). Este aumento de las respuestas de angiotensina II se había apreciado también en las ratas normotensas SDR alimentadas con suplementos dietéticos de calcio. Cuando comentamos los resultados obtenidos en las ratas normotensas, ya señalamos que esta alteración en la respuesta de los receptores de angiotensina II, podía ser en realidad un mecanismo para compensar la disminución que produce el calcio dietético en la respuesta α vasoconstrictora.

En cualquier caso, parece evidente que los suplementos de calcio disminuyen las respuestas de los receptores α_1 y α_2 vasculares en los sujetos hipertensos, y parece lógico que esta modificación de la reactividad vascular, pueda favorecer el control de la PA que el calcio dietético ejerce en ellos. En base a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con las ratas SDR, podemos así mismo afirmar que los suplementos dietéticos de calcio disminuyen también la respuesta de los receptores α_1 y α_2 vasculares en los sujetos normotensos. Hay que asumir sin embargo, que cuando los valores de la PA no sobrepasan los límites de la normalidad, los mecanismos que tienden a mantener el tono arterial, evitan que estos cambios en la reactividad vascular ocasionasen una disminución de esta variable. Merece la pena indicar que los estudios que nuestro grupo de investigación llevó a cabo hace algunos años en ratas normotensas e hipertensas con una dieta deficiente en calcio, demostraron que la deficiencia dietética de calcio no modificaba por el contrario las respuestas de los receptores α vasculares. La dieta deficiente en calcio aumentó la PA en las ratas normotensas SDR, y adelantó la aparición de los valores extremadamente altos de PA que caracterizan la fase de estabilización de esta variable en las ratas SHR. Es por lo tanto obvio, que los mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo del calcio, no son exactamente los mismos que los mecanismos que se alteran cuando aumenta la PA como consecuencia de una deficiencia dietética de calcio.

Hemos pasado por alto hasta este momento, comentar como se desarrollaban las ratas SHR que se alimentaron con la dieta enriquecida en calcio. Lo primero que hay que puntualizar, es que existen diferencias entre las pautas de crecimiento y maduración de las ratas SDR y de las ratas SHR. Las variaciones entre las razas probablemente sean debidas a diferencias genéticas, que lógicamente condicionan el metabolismo de los animales. La **figura 1R** (ver página 107) indica que las ratas SDR alimentadas con la dieta control pesaban aproximadamente 369 g cuando tenían 9 semanas de vida, y la **figura 2R** (página 110) indica que las ratas SHR alimentadas con esa misma dieta pesaban sólo unos 226 g cuando tenían esa edad. Las ratas SHR en realidad completan su desarrollo más tarde. La longitud de la cola es un índice del desarrollo corporal en las ratas, y este parámetro también puso de manifiesto que la raza hipertensa se desarrolla más lentamente. La longitud de la cola de las ratas SHR, fue de hecho siempre menor que la longitud de la cola de las ratas SDR, pudiendo apreciarse ya esta diferencia en el momento del destete (ver páginas 106 y 108). Hechas estas consideraciones, analizaremos ahora lo que realmente importa, que es saber si el calcio dietético condiciona el desarrollo de las ratas, y sobre todo saber si su efecto sobre la PA en cada raza puede relacionarse con las alteraciones que produce en el crecimiento en los animales. La administración de la dieta enriquecida en calcio tuvo en realidad efectos distintos sobre el desarrollo de las ratas SDR y sobre el desarrollo de las ratas SHR. Pudimos ver que el

desarrollo de las ratas SDR no se modificaba con esta dieta (ver la **tabla 1R** de la página 107 y la **figura 1R** que aparece en la misma página). Los suplementos de calcio tampoco habían alterado la PA de las ratas SDR. Para llegar a conclusiones definitivas sobre la relación señalada, habrá sin embargo que tener en cuenta que la dieta enriquecida en calcio aceleró la pauta de crecimiento de las ratas SHR sin modificar su ingesta, y esta dieta disminuía la PA de estos animales. Observamos que las ratas SHR alimentadas con la dieta enriquecida en calcio, se desarrollaban de hecho más rápidamente, y alcanzaban un peso corporal mayor, que las ratas SHR alimentadas con la dieta control (ver la **tabla 2R** y la **figura 2R** de las páginas 109 y 110, y ver así mismo la **tabla 19 R** y la **figura 17R** de las páginas 147 y 148). La longitud de la cola de los animales hipertensos al finalizar el período de alimentación, fue también mayor cuando se utilizaba la dieta enriquecida en calcio (ver página 108 en el estudio nº1, y página 143 en el estudio nº 2). Contrastan con estos resultados los de otros grupos de investigación que han señalado que paradójicamente las ratas alimentadas con dietas enriquecidas en calcio, presentan usualmente un retraso en el desarrollo corporal. Los investigadores que hicieron estas observaciones indicaron que este retraso podía precisamente condicionar la disminución de la PA que producen estas dietas (ver información y referencias del apartado de **Antecedentes** en la página 74). Los datos de esta Tesis Doctoral indican por el contrario que los suplementos dietéticos de calcio aceleran el desarrollo de las ratas SHR, y este hecho lógicamente no puede justificar el efecto antihipertensivo del calcio en estos animales. Concuerdan además con esta idea los resultados que nuestro grupo de investigación obtuvo hace algunos años cuando trabajaba con una dieta deficiente en calcio. Esta dieta ocasionaba una elevación de la PA en las ratas normotensas y en las ratas hipertensas, pero como era previsible, la deficiencia de calcio retrasaba el desarrollo corporal de todas estas ratas (López-Miranda et al., 1996). A nuestro juicio por lo tanto, se podría concluir que la modificación de la PA producida por el calcio dietético, es siempre independiente de su efecto sobre el desarrollo de los animales.

Aunque todavía no hemos analizado en conjunto todos los datos del estudio nº 2 de esta Tesis Doctoral, creemos oportuno comentar también ahora cómo se desarrollaban las ratas que se trataban con amlodipino en dicho estudio. El tratamiento crónico con amlodipino no modificó en realidad el desarrollo de las ratas SHR, y tampoco modificó la ingesta de dieta sólida en estos animales. Los resultados del peso corporal y de la longitud de la cola de las ratas SHR tratadas con este fármaco aparecen en la **tabla 19R** de la página 147, en la **figura 17R** de la página 148 y en el texto de la página 145. En estas mismas tablas y figuras puede comprobarse que el tratamiento con amlodipino frenó sin embargo algo el incremento de peso que se apreciaba con la dieta enriquecida en calcio en las ratas SHR. La explicación de este hecho no parece fácil. Cabe pensar que por sus propiedades antagonistas del calcio, el

amlodipino pudiera inhibir la entrada de este ión en las distintas células del organismo, impidiendo así en parte los efectos metabólicos del calcio.

Hasta este momento hemos discutido las alteraciones que produce la dieta enriquecida en calcio cuando se administra como único tratamiento a los animales. Comentaremos ahora conjuntamente todos los resultados del segundo estudio de esta Tesis Doctoral. En este segundo estudio quisimos evaluar el efecto que podía tener la administración prolongada de la dieta enriquecida en calcio con amlodipino en los animales hipertensos. Lógicamente para interpretar correctamente los resultados obtenidos en estos animales, será necesario conocer lo que sucede cuando se les administra únicamente el antagonista del calcio durante el mismo período de tiempo, y será también necesario tener presente el efecto de la dieta enriquecida en calcio en animales hipertensos no tratados farmacológicamente. Por todos estos motivos, el segundo estudio de esta Tesis Doctoral se programó con cuatro grupos de ratas SHR que se trataban hasta que tenían 25 semanas de vida de la siguiente forma. Uno de estos grupos se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio y se trataba con amlodipino. Otro se trataba con amlodipino pero se alimentaba con la dieta de contenido normal en calcio. El tercero se alimentaba con la dieta enriquecida en calcio pero no recibía tratamiento farmacológico, y por último el cuarto grupo se alimentaba con la dieta de contenido normal en calcio y no recibía tampoco tratamiento farmacológico.

Las variaciones de la PA que se producían en los cuatro grupos de ratas SHR mencionados, permitieron establecer tres intervalos de tiempo en la vida de estos animales. Podríamos considerar que existe un primer intervalo de tiempo desde que las ratas SHR comienzan a desarrollarse hasta que tienen 11-12 semanas de vida, en la que los animales de esta raza son bastante insensibles a los tratamientos utilizados. Este período coincide con la etapa en la que las ratas de esta raza no tratadas muestran un aumento progresivo de los valores de la PA. Los resultados de esta Tesis Doctoral indican en realidad que durante esta etapa de la vida, las ratas SHR son insensibles al incremento del calcio dietético, y su PA no se modifica tampoco por el tratamiento farmacológico con amlodipino. Las medidas de la PAS y de la PAD que aparecen en la **tabla 20R** de la página 153 y en la **figura 18R** de la página 154 avalan esta idea. Ya hemos recordado en esta Discusión algunos trabajos de nuestro grupo de investigación, que demostraron que en esta etapa de la vida, las ratas SHR presentaban por el contrario un aumento aún más llamativo de la PA cuando se alimentaban con dietas deficientes en calcio. Podríamos por lo tanto definir este intervalo de tiempo, como una etapa en la que las ratas SHR son sensibles a la deficiencia dietética de calcio, pero no responden a los suplementos de calcio ni a los tratamientos farmacológicos antihipertensivos. Es muy probable, que en esta etapa de la vida, en la que los animales no han completado su desarrollo, y no han

alcanzado los niveles de PA estables que caracterizan su condición de hipertensos, tengan poco éxito en general todos los tratamientos que intentan disminuir los valores de esta variable. Hay que tener en cuenta que por su condición genética, las ratas SHR tienen en esta etapa de la vida una tendencia muy marcada a presentar cifras cada vez más altas de PA, y responden probablemente mal a todos los tratamientos que intentan controlar este aumento. Es fácil comprender que por el contrario, las manipulaciones que intentan producir un aumento de la PA en esta etapa de la vida aceleren el desarrollo de la HTA en estos animales.

Siguiendo como criterio la sensibilidad de los animales hipertensos a los tratamientos utilizados, el segundo intervalo en la vida de las ratas SHR está definido por el tiempo transcurrido desde que estos animales tienen 13 semanas de vida, hasta que tienen aproximadamente 18 semanas de vida. Este intervalo de tiempo coincide prácticamente con la etapa en la que se sabe que la PA de las ratas SHR se estabiliza. Por eso en él podremos estudiar mejor el efecto antihipertensivo de nuestros tratamientos. Durante todas las semanas de este período, los valores de la PAS y de la PAD de las ratas SHR alimentadas con la dieta de contenido normal en calcio, fueron en realidad muy semejantes. Los valores de la PAS y de la PAD obtenidos en las ratas SHR que se alimentaban con la dieta enriquecida en calcio, fueron sin embargo menores (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la **figura 18AR** de la página 154). Es decir, también en este segundo estudio pudimos comprobar que existía un período de tiempo en el que las ratas SHR eran sensibles al tratamiento con suplementos dietéticos de calcio. A esta conclusión también habíamos llegado cuando comentamos los resultados del estudio nº 1 de esta Tesis Doctoral. Lo que queremos sin embargo resaltar ahora, es que en el segundo estudio pudimos comprobar también que durante este período de tiempo, los valores de la PAS y de la PAD, eran todavía menores cuando las ratas SHR alimentadas con suplementos dietéticos de calcio se estaban tratando además con 1 mg/kg/día de amlodipino. Estas variables no se modificaban sin embargo cuando las ratas SHR recibían la misma dosis de amlodipino pero se estaban alimentando con la dieta de contenido normal en calcio. Podemos por lo tanto decir, que en las ratas SHR que tienen edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida, y que tienen por lo tanto valores bastante estables de PA, la administración de suplementos dietéticos de calcio consigue controlar en parte la HTA, y el tratamiento simultáneo con una dosis baja de amlodipino puede mejorar este control. Las dosis bajas de este fármaco no parecen sin embargo capaces de promover por sí mismas una disminución de la PA en estos animales. Definiríamos por lo tanto este intervalo de tiempo, como una etapa en la que las ratas SHR son sensibles al tratamiento con suplementos de calcio y son insensibles al tratamiento con dosis bajas de antagonistas del calcio, pero curiosamente responden mejor a los suplementos de calcio si se tratan con cantidades pequeñas de estos fármacos. Veremos también en esta Discusión que la sensibilidad de las

ratas SHR a los tratamientos utilizados en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral, permite establecer otro período posterior en la vida de estos animales que comienza cuando tienen aproximadamente 19 semanas de vida. Expondremos antes sin embargo algunas ideas que intentan explicar lo que puede suceder en el miocito liso vascular de las ratas SHR tratadas desde el destete con calcio y/o amlodipino, cuando estos animales tienen edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida. Estas ideas quedan reflejadas en la **figuras 1D, 2D y 3D** (páginas 197, 199 y 203 respectivamente) que comentaremos a continuación.

La **figura 1D** de la página 197, refleja concretamente lo que puede suceder en el miocito liso vascular de las ratas SHR que tienen edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida, cuando estos animales se han estado tratando con suplementos dietéticos de calcio desde el destete. Comentaremos a continuación esta figura. Lo primero que hay que tener en cuenta para entender la **figura 1D**, es que cuando aumenta la ingesta de calcio este elemento se absorbe en mayor medida y se produce un aumento del calcio plasmático extracelular. Como consecuencia de este aumento plasmático de calcio, la concentración de hormonas vasoconstrictoras con efectos calciotrópicos, tales como PTH, FHP y calcitriol, disminuirá. El incremento del calcio extracelular producido por los suplementos dietéticos de calcio, puede por otra parte mejorar los mecanismos de extrusión celular de este ión. No hay que olvidar que en la HTA aumentan en realidad los niveles plasmáticos de las hormonas vasoconstrictoras (ver la información y las referencias correspondientes que figuran en las páginas 76 y 77 del apartado de **Antecedentes**), y tampoco hay que olvidar que los mecanismos de extrusión celular de calcio están así mismo alterados en esta patología (ver la información y las referencias correspondientes que figuran en la página 78 del apartado de Antecedentes). Los suplementos dietéticos de calcio podrían corregir estas alteraciones en las ratas hipertensas, de forma que al normalizar el nivel de hormonas vasoconstrictoras calciotrópicas, y al normalizar la extrusión de calcio, producirían paradójicamente un aumento mayor del nivel de calcio en el plasma de estos animales. Ya indicamos en su momento que los niveles plasmáticos de calcio total y de calcio iónico aumentaban en las ratas SHR que tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida cuando estos animales se habían alimentado con la dieta enriquecida en calcio (ver la **tabla 5R** y la **figura 5R** de las páginas 117 y 118, y ver así mismo la **tabla 22R** y la **figura 20R** de las páginas 159 y 160). Lo que es sobre todo importante sin embargo, es que cuando se administran suplementos de calcio, la salida de calcio desde la célula ocasiona lógicamente una disminución del calcio intracelular. Es muy probable que las reservas intracelulares de este ión sean insuficientes para contrarrestar esta disminución, y por este motivo en los animales que reciben suplementos de calcio será más difícil la contracción del miocito liso vascular. De hecho, nosotros hemos observado menor PA en las ratas SHR tratadas con suplementos de calcio que tenían edades comprendidas entre 13 y 18

semanas de vida. La disminución de calcio en el miocito liso vascular de estos animales previsiblemente podría condicionar también mayor dificultad para sus respuestas α vasoconstrictoras. Hemos comentado ya en esta Discusión sin embargo, que las respuestas de los agonistas α en las ratas SHR que tenían 15-16 semanas de vida, eran semejantes cuando habíamos utilizado la dieta enriquecida en calcio y cuando habíamos utilizado la dieta control (ver la **tabla 26R** y la **figura 23R** de las páginas 168 y 169, y ver así mismo la **tabla 27R** y la **figura 24R** de las páginas 168 y 170). Para explicar ésto en su momento sugerimos que los receptores α vasculares de los animales de esta edad probablemente no habían madurado aún. En ese momento de la vida los receptores del miocito liso vascular de las ratas SHR mostrarían una tendencia a aumentar su número o su sensibilidad a las hormonas vasoconstrictoras, y por este motivo no podría apreciarse el efecto de los suplementos de calcio sobre las respuestas de estos receptores. Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Expondremos ahora lo que puede suceder en el miocito liso vascular de las ratas SHR que tienen edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida, cuando estos animales han estado recibiendo un tratamiento con amlodipino desde el momento del destete. En la **figura 2D** de la página 199 presentamos un esquema que refleja estos procesos. Por definición la administración de un antagonista del calcio ocasiona una disminución de la entrada de calcio al interior de la célula. Es por ello probable que los niveles extracelulares de calcio aumenten cuando se administran estos fármacos. En la **tabla 22R** de la página 159 y en la **figura 20R** de la página 160, pudimos ver que el calcio total y el calcio iónico en el plasma de las ratas SHR de 16 semanas de vida tratadas con amlodipino, eran en realidad mayores que los correspondientes valores de calcio total y de calcio iónico en el plasma de las ratas SHR de esa edad del grupo control. La calcemia que presentaban las ratas SHR tratadas con amlodipino, refleja por lo tanto el aumento del calcio extracelular que puede ocasionar este fármaco. El tratamiento con la dosis de 1 mg/kg/día de amlodipino no fue sin embargo capaz de disminuir la PA de estos animales. Es probable que el anestésico utilizado para poder medir la PA de las ratas SHR adecuadamente, haya atenuado algo las diferencias entre los distintos grupos de animales. Sin embargo, es también probable que cuando se administra esta dosis de amlodipino, las reservas intracelulares de calcio puedan compensar en buena medida la disminución de la entrada de este ión a la célula. La concentración intracelular de calcio libre en el miocito liso vascular sería por lo tanto suficiente todavía para la contracción, y la PA no se alteraría. Esto en principio podrá suceder siempre que la dosis del antagonista del calcio no sea muy alta, y sabemos que en realidad la dosis de amlodipino utilizada en esta Tesis Doctoral no lo era. Como ya comentamos en esta Discusión, la administración de 1 mg/kg/día de amlodipino había ocasionado sólo modificaciones discretas de la PA en las ratas SHR conscientes de un estudio anterior. Lo que sí es cierto es que el tratamiento con amlodipino ocasionó un ligero aumento de las respuestas α vasoconstrictoras. Este aumento no resultó significativo, pero pudo apreciarse cuando realizábamos ensayos en la preparación de “pithed rat” con ambos agonistas α (ver la **tabla 26R** y la **figura 23R** de las páginas 168 y 169, y ver así mismo la **tabla 27R** y la **figura 24R** de las páginas 168 y 170). Sabemos que la administración aguda de los antagonistas del calcio ocasiona en realidad una disminución de las respuestas presoras de los agonistas α en la preparación de “pithed rat”. Es fácil comprender que suceda esto porque la vasoconstricción que producen estos compuestos depende en parte del aporte extracelular de calcio. Lo que hay que tener sin embargo en cuenta ahora, es que los efectos de un tratamiento agudo no tienen porque ser los mismos que los efectos de un tratamiento crónico. Este hecho permite que podamos justificar el aumento de la reactividad α vascular observado en las ratas SHR que se estaban tratando con amlodipino desde el momento del destete. En realidad, la inhibición de la entrada de calcio que producen

las dosis bajas de amlodipino puede ser insuficiente para causar alteraciones de la contracción, pero la administración continuada del fármaco haría que las reservas intracelulares de este ión fuesen disminuyendo paulatinamente. En estas condiciones, es muy posible que otros mecanismos se pongan en marcha para mantener el tono arterial. Podríamos concretamente considerar la posibilidad de que los receptores α vasculares de estas ratas SHR tratadas crónicamente con amlodipino, aumentasen su sensibilidad a las hormonas y a los agonistas vasoconstrictores. Otra alternativa con las mismas consecuencias, sería que en estos animales aumentase la población de los receptores α que medían las respuestas vasoconstrictoras. En cualquier caso, la salida de calcio desde el retículo sarcoplásmico y el aumento de la respuesta de los receptores α , pueden ser mecanismos para contrarrestar el efecto del antagonista del calcio en el miocito liso vascular. Estos mecanismos harían en realidad que el tratamiento con la dosis de amlodipino que hemos utilizado, no alterase la PA de las ratas SHR cuando estos animales tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida. Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Queda por analizar lo que puede suceder en el miocito liso vascular de las ratas SHR que tienen edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida, cuando a estos animales se les ha tratado con suplementos de calcio y amlodipino desde el momento del destete. Para ello tendremos lógicamente que considerar la resultante de los efectos individuales de ambos tratamientos en ese momento. Esta resultante se refleja en la **figura 3D** de la página 203. Comentaremos a continuación esa figura. Como bien sabemos, la administración de amlodipino ocasiona una disminución de la entrada de calcio a la célula. El tratamiento con suplementos de calcio mejora el funcionamiento de los mecanismos de extrusión celular de este ión, y produce un aumento de su salida desde el interior del miocito liso vascular hacia el medio extracelular. El calcio dietético dificulta además la entrada de este ión a la célula porque disminuye la síntesis de algunas hormonas calciotrópicas. Teniendo en cuenta todo esto, es fácil comprender que cuando ambos tratamientos se utilizan conjuntamente, se produzca una disminución importante del nivel intracelular de calcio libre. Esta disminución en cualquier caso será mayor que la disminución del calcio intracelular que puede producir el amlodipino o el calcio dietético si se administran aisladamente. La contracción por lo tanto disminuirá también más si se administran ambos tratamientos que si únicamente se administra uno. Si tenemos en cuenta las anteriores consideraciones, no puede sorprendernos en realidad el efecto sinérgico que muestran los suplementos de calcio y el amlodipino para el control de la PA en las ratas hipertensas. Este sinergismo se pudo apreciar observando los niveles de la PAS y de la PAD de las ratas SHR tratadas con la dieta enriquecida en calcio y con amlodipino, cuando estos animales tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la **figura 18R** de la página 154). Del mismo modo, habrá también que considerar que la administración simultánea de la dieta y el fármaco, debe ocasionar un aumento mayor del nivel extracelular de calcio que la administración de cada uno de estos tratamientos. No puede por ello sorprendernos tampoco que en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral, la calcemia de las ratas SHR que tenían 16 semanas de vida, fuese especialmente alta cuando los animales se habían estado tratando con suplementos de calcio y con amlodipino (ver la **tabla 22R** de la página 159 y la **figura 20R** de la página 160). En lo que respecta a la respuesta de los receptores α del miocito liso vascular de las ratas de esta edad tratadas con suplementos dietéticos de calcio y con amlodipino desde el destete, habrá también que tener en cuenta el efecto de ambos tratamientos sobre estos receptores. El tratamiento con suplementos dietéticos de calcio no era capaz de modificar la respuesta α vasoconstrictora en estos animales por la inmadurez de sus receptores, pero cuando se administraba amlodipino se apreciaba en ellos a pesar de todo un aumento de la reactividad α que intentaba compensar la disminución de la entrada de calcio producida por el fármaco. Teniendo en cuenta todo esto, no podrá sorprendernos que los animales que reciben el tratamiento con calcio y amlodipino,

presenten también un aumento de la respuesta de los receptores α vasculares. De hecho, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística, las respuestas de metoxamina y de B-HT 920 en la preparación de “pithed rat”, fueron algo mayores cuando utilizábamos ratas SHR de 16 semanas de vida alimentadas con la dieta enriquecida en calcio y tratadas con amlodipino, que cuando utilizábamos ratas SHR de esa edad del grupo control (ver la **tabla 26R** y la **figura 23R** de las páginas 168 y 169, y ver así mismo la **tabla 27R** y la **figura 24R** de las páginas 168 y 170). Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Las alteraciones de la PA que apreciamos en las ratas SHR tratadas con suplementos de calcio y/o amlodipino desde el destete, no fueron iguales cuando los animales tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida y cuando tenían más edad. El período comprendido entre las 19 y las 25 semanas de vida, era un intervalo de tiempo en el que pudimos apreciar mejor algunos efectos que tardaban en aparecer, y algunos efectos que aparecían en las ratas como procesos de adaptación después de las distintas administraciones. Podemos recordar que en las ratas SHR que tenían edades comprendidas entre 19 y 25 semanas de vida, seguíamos observando una disminución de los valores de la PAS y de la PAD cuando se administraba la dieta enriquecida en calcio. La disminución era sin embargo menor que la que observábamos con esta dieta en los animales más jóvenes que tenían edades comprendidas entre 13 y 18 semanas de vida (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la **figura 18AR** de la página 154). En su momento señalamos que los mecanismos de adaptación o contraregulación para mantener el tono arterial, pueden en realidad atenuar algo el efecto de los suplementos de calcio. Por este motivo, es fácil entender que la dieta enriquecida en calcio pierda en parte su eficacia cuando se administra durante un período prolongado de tiempo. Por otra parte, las ratas SHR tratadas desde el destete con amlodipino que tenían más de 19 semanas de vida, presentaban valores de PAS y de PAD más bajos que los animales de esa edad del grupo control (ver la **tabla 20R** de la página 153 y la **figura 18BR** de la página 154). Esta disminución de la PAS y de la PAD no se había observado en las ratas SHR más jóvenes tratadas con el fármaco, pero hay que tener en cuenta que los animales que tenían 19 semanas de vida o más, habían estado recibiendo el antagonista del calcio durante mucho tiempo. Por lo tanto, en las ratas SHR que tenían entre 19 y 25 semanas de vida, además de apreciar el efecto antihipertensivo del calcio, podíamos también apreciar el efecto antihipertensivo del antagonista del calcio. Lo que resulta sin embargo curioso, es que la administración conjunta de calcio y amlodipino desde el destete, no modificase, e incluso aumentase algo, la PA de los animales hipertensos que tenían esas edades. En la **tabla 20R** de la página 153, y en la **figura 18CR** de la página 154, se puede observar de hecho que cuando las ratas SHR tratadas con calcio y amlodipino desde el destete tenían más de 19 semanas de vida, presentaban paradójicamente valores de PAS y de PAD muy semejantes a los de los animales de la misma edad en los que no habíamos utilizado ninguna medida para controlar la HTA. Es más, en ocasiones como acabamos de decir, los valores de la PAD de los animales que estaban recibiendo ambos tratamientos eran mayores que los del grupo control. Así pues, aunque los suplementos dietéticos de calcio y los antagonistas del calcio son tratamientos antihipertensivos eficaces que pueden presentar efectos sinérgicos, hay que asumir que cuando la administración simultánea de ambos tratamientos se prolonga, llega un momento en el que estas medidas antihipertensivas pueden anular mutuamente su eficacia.

Intentaremos explicar ahora lo que puede suceder en el miocito liso vascular de las ratas SHR que se han tratado mucho tiempo con suplementos de calcio en la dieta y/o amlodipino. Comentaremos primero el efecto que puede tener en esta célula el tratamiento prolongado con suplementos de calcio. Este efecto se refleja en la **figura 4D de la página 207**. Sabemos que los suplementos dietéticos de calcio mejoran la extrusión celular de este ión, y disminuyen la síntesis de hormonas calciotrópicas. Por este motivo, siempre que aumenta la ingesta de calcio, este ión sale en principio de la célula con mayor facilidad. Esto lógicamente contribuye a que aumente el calcio plasmático. No nos puede sorprender por lo tanto que las ratas SHR tratadas con suplementos de calcio durante mucho tiempo, tengan valores de calcemia más altos de los normales. Puede apreciarse sin embargo que el calcio total y el calcio iónico en el plasma de las ratas SHR que tenían 20 y 23 semanas de vida, no eran tan altos como el calcio total y el calcio iónico en el plasma de los animales más jóvenes que habían recibido suplementos dietéticos de calcio menos tiempo (ver la **tabla 5R** y la **figura 5R** de las páginas 117 y 118, y ver así mismo la **tabla 22R** y la **figura 20R** de las páginas 159 y 160). Este hecho puede relacionarse con los siguientes procesos de adaptación. La administración de calcio sabemos que promueve una disminución del funcionamiento de las glándulas paratiroides y de la síntesis de PTH y calcitriol, pero estas hormonas controlan en último término la homeostasis del calcio, y la disminución de su síntesis ocasiona a su vez una menor movilización ósea de este elemento, y ocasiona también una disminución de su absorción digestiva y una disminución de su reabsorción tubular renal. De este modo, cuando se prolonga un tratamiento con suplementos de calcio, se producirá finalmente un reajuste de la calcemia que podrá compensar en parte su efecto inicial. En estas condiciones la extrusión celular de este ión será también algo menor, y como las células vuelven a disponer de más calcio para su contracción, la PA no será tan baja como cuando se inicia el tratamiento. Ya hemos señalado en realidad, también que el efecto que tienen los suplementos de calcio sobre la PA, se atenuaba algo cuando se prolonga su administración. Hay que recordar sin embargo que las respuestas de los agonistas α en la preparación de "pithed rat" cuando utilizábamos ratas SHR tratadas mucho tiempo con suplementos de calcio, eran menores que las respuestas correspondientes en los animales de la misma edad alimentados con la dieta control. Los resultados obtenidos con metoxamina en las ratas SHR de 20 semanas de vida figuran en la **tabla 16R** y en la **figura 14R** de las páginas 139 y 140, y los resultados obtenidos con B-HT 920 en estos animales figuran así mismo en la **tabla 17R** y en la **figura 15R** de las páginas 141 y 142. Los resultados obtenidos con metoxamina en las ratas SHR de 23 semanas de vida figuran en la **tabla 28R** y en la **figura 25R** de las páginas 173 y 174, y los resultados obtenidos con B-HT 920 en estos animales figuran así mismo en la **tabla 29R** y en la **figura 26R** de las páginas 173 y 175. La disminución de las respuestas α vasoconstrictoras que presentaban los animales alimentados mucho tiempo con suplementos dietéticos de calcio,

puede relacionarse con la disminución del calcio intracelular que a pesar de todo ocasiona siempre este tratamiento. En los animales más jóvenes, que se habían tratado con calcio menos tiempo, no pudimos apreciar la disminución de estas respuestas porque sus receptores α todavía estaban madurando. Lógicamente en las ratas SHR de más edad estos receptores habrán completado su maduración. Queda por lo tanto claro que la dieta enriquecida en calcio disminuye la contracción del miocito liso vascular, y disminuye también la respuesta vasoconstrictora mediada por sus receptores α . Estos efectos sin embargo no necesariamente coinciden en el tiempo, y en realidad, la disminución de la reactividad α vascular pudo apreciarse únicamente cuando los mecanismos de adaptación al incremento del calcio dietético permitían que la contracción celular y la PA se hubiesen recuperado algo. Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Los efectos que puede ocasionar el tratamiento prolongado con amlodipino en el miocito liso vascular de las ratas SHR se reflejan en la **figura 5D** de la página 209. Comentaremos a continuación esta figura. Recordemos que la PA de las ratas SHR de 13-18 semanas de vida tratadas desde el destete con amlodipino, no había disminuido. Señalamos en su momento que en estos animales probablemente las reservas intracelulares de calcio compensaban el bloqueo del canal iónico producido por el fármaco. En las ratas SHR que tienen más de 19 semanas de vida, el antagonista del calcio habrá estado actuando más tiempo. Aunque la dosis administrada no sea muy alta, cabe pensar que después de mantener en estos animales tanto tiempo atenuada la entrada de calcio al interior celular, los depósitos intracelulares de este ión no puedan compensar el bloqueo del canal, y disminuya por lo tanto la concentración de calcio libre y la contracción del miocito liso vascular. Este bloqueo del canal iónico producirá por el contrario un aumento de la concentración de calcio extracelular. Estas ideas están en consonancia con los datos de la PA ya comentados correspondientes a las ratas SHR de 23 semanas de vida que se habían tratado durante mucho tiempo con amlodipino, y están así mismo en consonancia con los resultados de las determinaciones de calcemia de estos animales que aparecen en la **tabla 22R** de la página 159, y en la **figura 20R** de la página 160. Por otra parte, en estas ratas, al igual que sucedía en los animales más jóvenes que se habían tratado menos tiempo con amlodipino, pudimos apreciar un aumento de las respuestas α vasoconstrictoras (ver la **tabla 28R** y la **figura 25R** de las páginas 173 y 174, y ver así mismo la **tabla 29R** y la **figura 26R** de las páginas 173 y 175). Este aumento de la respuesta de los receptores α del miocito liso vascular, se produce probablemente siempre que se mantiene un tratamiento crónico con un antagonista del calcio. En realidad ya comentamos que puede ser un mecanismo para mantener la contracción y compensar la disminución del calcio intracelular que producen estos fármacos. Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Los efectos que puede ocasionar el tratamiento prolongado con suplementos de calcio y amlodipino en el miocito liso vascular de las ratas SHR se reflejan en la **figura 6D** de la página 211. Comentaremos a continuación esta figura. Sabemos que los antagonistas del calcio son fármacos antihipertensivos eficaces, y también sabemos que paradójicamente la administración de calcio y el correspondiente aumento de la calcemia, ocasionan en principio una disminución de la concentración intracelular de este ión y una disminución de la PA. Para interpretar la **figura 6D** hay sin embargo que tener en cuenta que por definición los efectos de un antagonista del calcio deben revertirse cuando se administra calcio. Es decir, los canales de calcio que existen en el miocito liso vascular se bloquean cuando se administra un antagonista del calcio, pero el calcio puede a su vez desplazar al antagonista del calcio de su receptor localizado en el canal, impidiendo así este bloqueo. Cuando se administran ambos tratamientos conjuntamente, es fácil comprender que si la dosis del antagonista del calcio no produce una disminución importante de la entrada de calcio por los canales voltaje-dependientes, el calcio extracelular pueda intentar poner en marcha otros mecanismos para disminuir la concentración intracelular de este ión. De hecho, en las ratas que tenían menos de 19 semanas de vida no se apreciaban los efectos antihipertensivos del amlodipino porque la dosis administrada era baja, y sabemos que en ellas los suplementos dietéticos de calcio facilitaban la extrusión celular de calcio y ocasionaban un aumento de la calcemia y una disminución de la PA. Pudimos observar que cuando prolongábamos más el tratamiento con amlodipino, se apreciaban ya sus efectos antihipertensivos, y hemos asumido que ésto era debido a que el bloqueo permanente del canal de calcio finalmente producía una disminución importante de la concentración intracelular de este ión. En las ratas que se habían tratado más tiempo con amlodipino, se observaba en realidad una disminución de la PA, y en ellas es lógico pensar que el calcio extracelular no intente sacar más calcio de la célula, e intente por el contrario desplazar al antagonista del calcio de su receptor para evitar que este fármaco siga bloqueando el canal iónico. Estos razonamientos nos permiten sin lugar a dudas justificar el efecto que tuvo el tratamiento prolongado con suplementos dietéticos de calcio y amlodipino sobre la PA de las ratas SHR. De hecho en las ratas que tenían más de 19 semanas de vida, y que por consiguete se habían tratado durante mucho tiempo con amlodipino, la dieta enriquecida en calcio revirtió el efecto antihipertensivo del fármaco. Hay de todos modos que tener en cuenta que los animales que recibían mucho tiempo el tratamiento conjunto con suplementos de calcio y amlodipino tenían niveles altos de calcemia (ver la tabla 22R de la página 156, y ver así mismo la figura 20R de la página 157), y probablemente sus niveles intracelulares de calcio eran también algo más bajos que los de los animales no tratados que tenían la misma edad. Esta idea justifica que las respuestas de los agonistas α hayan sido a pesar de todo algo menores en las ratas de 19 semanas de vida tratadas crónicamente con calcio y amlodipino, que en las ratas de la misma edad del grupo control (ver la **tabla 28R** y la **figura 25R** de las páginas 173 y 174, y ver

así mismo la **tabla 29R** y la **figura 26R** de las páginas 173 y 175). La disminución de la respuesta α vasoconstrictora en las ratas que recibían el tratamiento conjunto mucho tiempo, no era sin embargo tan llamativa como la que habíamos observado en los animales de la misma edad que se habían tratado únicamente con suplementos de calcio. Esto puede también entenderse porque el tratamiento crónico con el fármaco sabemos que produce un aumento de estas respuestas. Es decir, para entender como se altera la respuesta α vasoconstrictora en las ratas tratadas mucho tiempo con calcio y con amlodipino, hay que tener en cuenta que la administración crónica de cada uno de estos tratamientos tiene efectos opuestos sobre esta respuesta. Como ya hemos señalado, todos estos hechos se reflejan en la siguiente figura.

Después de analizar todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en las ratas tratadas con calcio y con amlodipino, hemos llegado a la siguiente conclusión. Los suplementos dietéticos de calcio únicamente podrán favorecer el efecto de los antagonistas del calcio cuando la dosis del fármaco no esté produciendo un bloqueo importante del canal iónico. Por el contrario, cuando un antagonista del calcio está produciendo una disminución significativa de la PA, la administración simultánea de calcio en la dieta no aumentará la eficacia del fármaco. Más aún, en este caso los suplementos de calcio podrán acabar revirtiendo su efecto antihipertensivo. Por lo tanto, en la mayoría de los casos no resultará beneficiosa la administración conjunta de los dos tratamientos, y como el tratamiento de la HTA debe mantenerse usualmente de por vida, hay que asumir que en el momento actual esta combinación no representa una alternativa útil para el control de la PA de los pacientes hipertensos.

Creemos haber cumplido los objetivos previstos en esta Tesis Doctoral, y en esta Discusión hemos presentado una interpretación de sus resultados que avala las **Conclusiones** que figuran en el apartado siguiente.

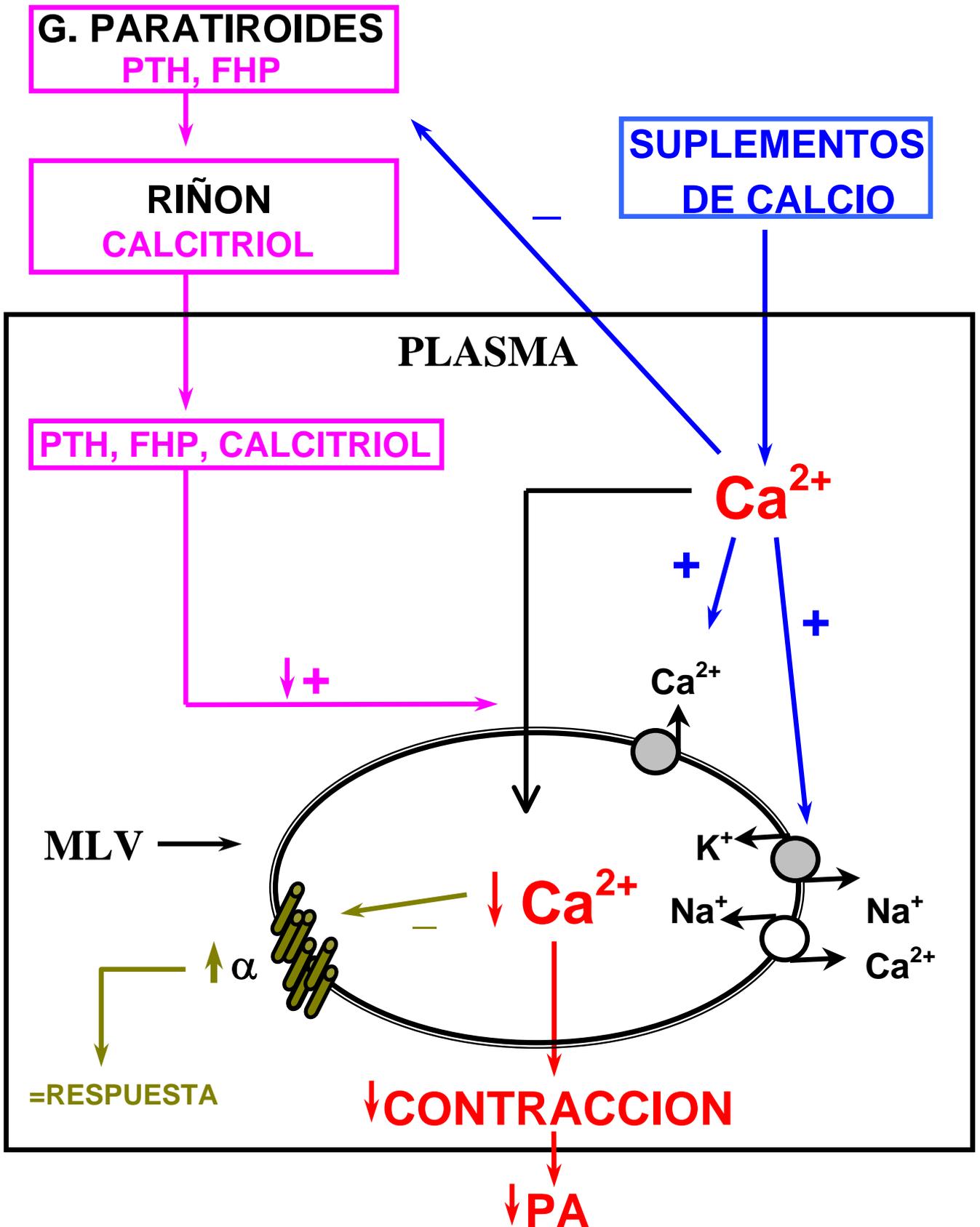


Figura 1D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas de 13-18 semanas de vida, que están recibiendo un tratamiento crónico con suplementos dietéticos de calcio desde el destete. PTH: parathormona, FHP: factor hipertensivo paratiroideo, MLV: miocito liso vascular, PA: presión arterial.

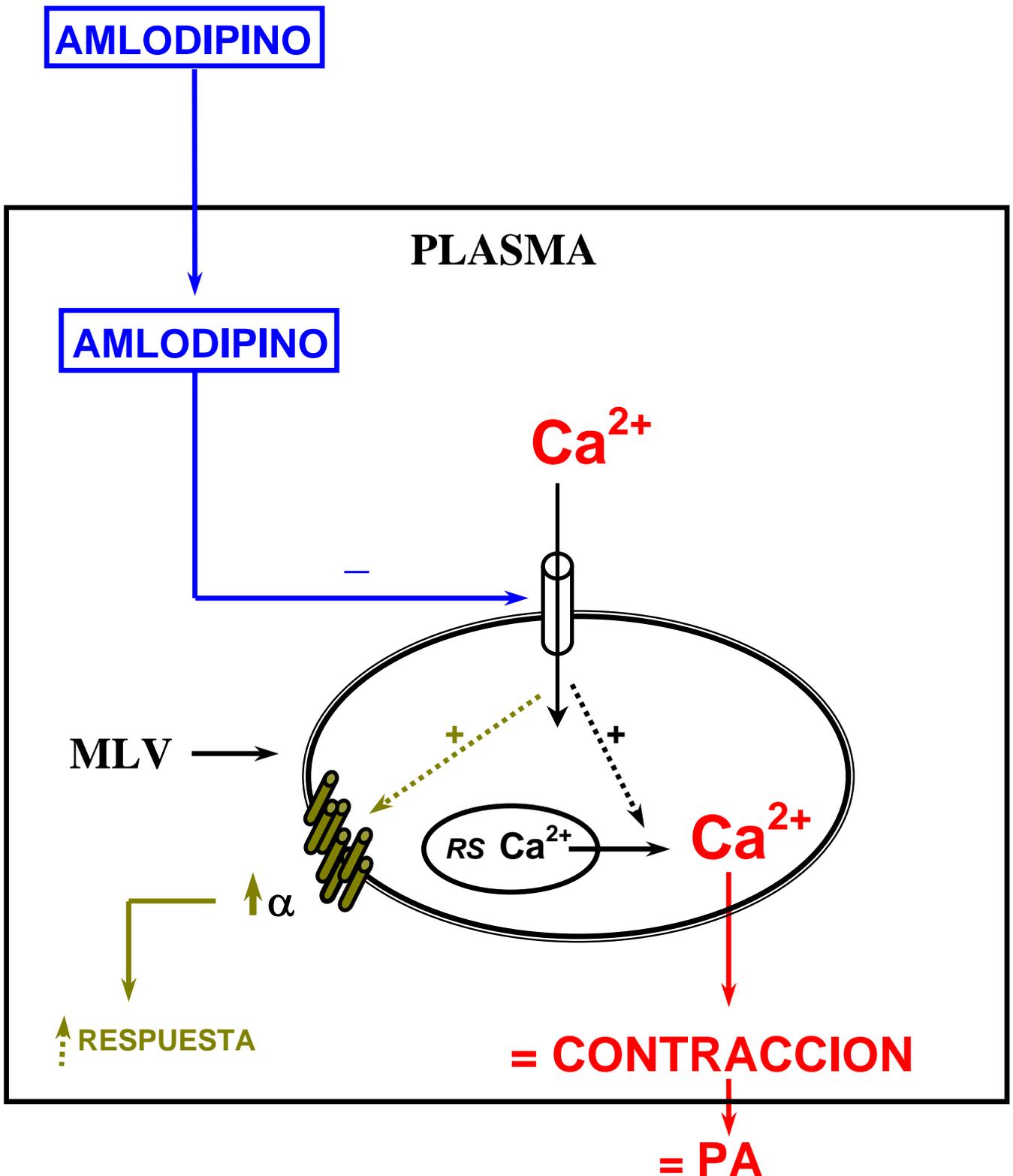


Figura 2D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas de 13-18 semanas de vida, que están recibiendo un tratamiento crónico con una dosis baja de amlodipino desde el destete. Se utilizan flechas con líneas discontinuas para indicar procesos compensadores, y también para indicar los cambios que se producen como consecuencia de estos procesos. MLV: miocito liso vascular, RS: retículo sarcoplásmico, PA: presión arterial.

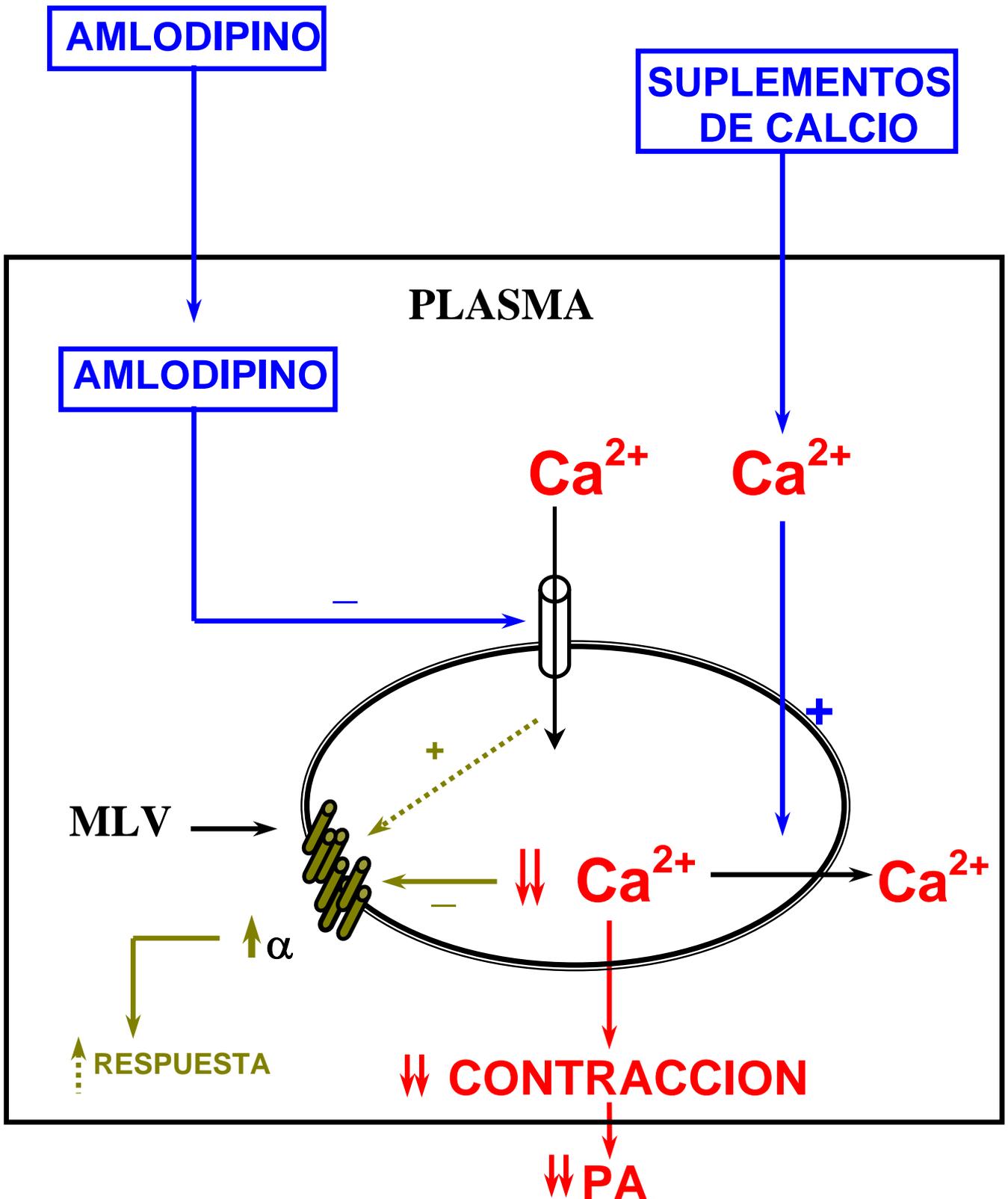


Figura 3D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas de 13-18 semanas de vida, que están recibiendo un tratamiento crónico con suplementos de calcio y con una dosis baja de amlodipino desde el destete. Se utilizan flechas con líneas discontinuas para indicar procesos compensadores, y también para indicar los cambios que se producen como consecuencia de estos procesos. MLV: miocito liso vascular, PA: presión arterial.

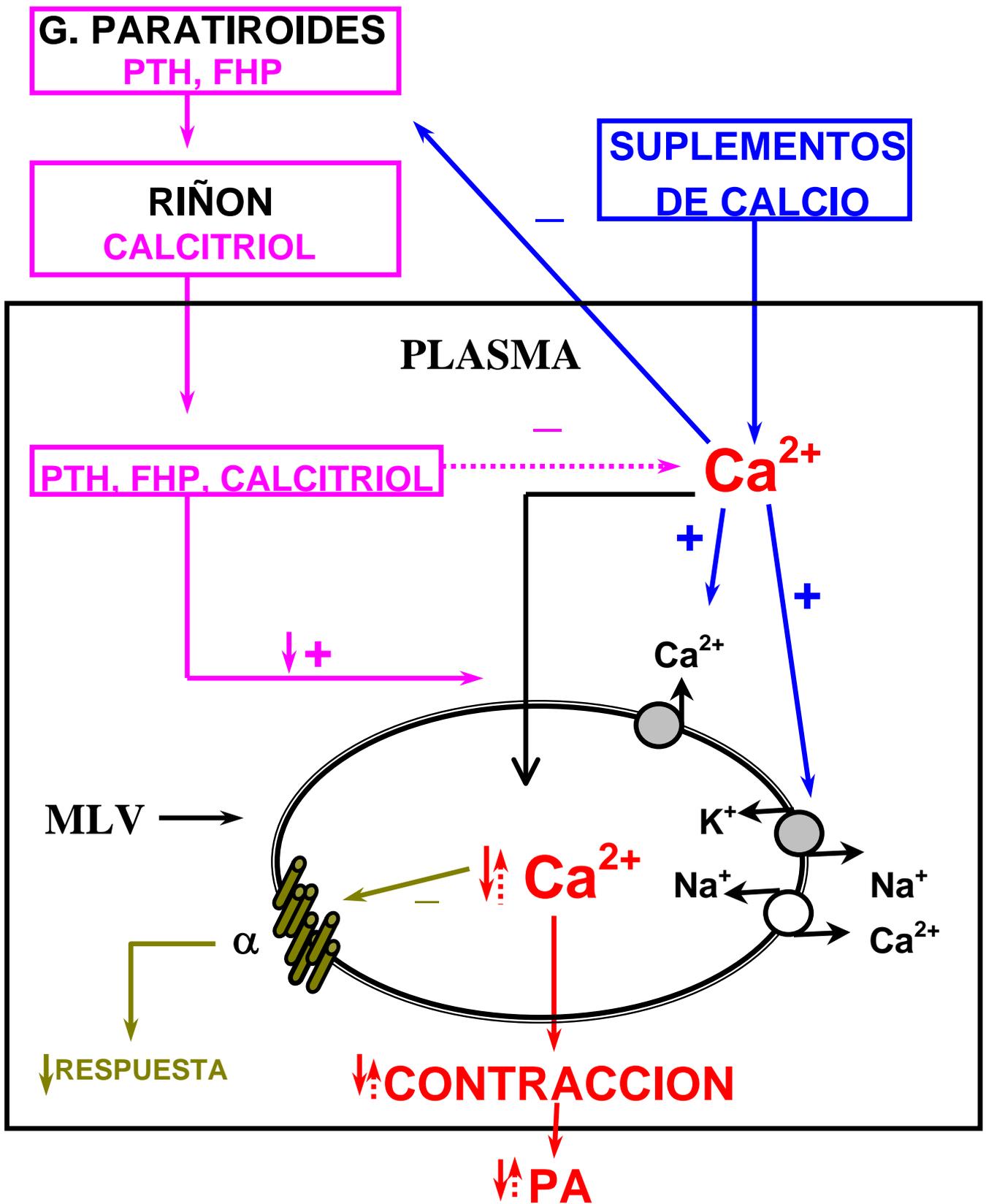


Figura 4D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas que se han tratado durante un período muy prolongado de tiempo con suplementos dietéticos de calcio. Se utilizan flechas con líneas discontinuas para indicar procesos compensadores, y también para indicar los cambios que se producen como consecuencia de estos procesos. PTH: parathormona, FHP: factor hipertensivo paratiroideo, MLV: miocito liso vascular, PA: presión arterial.

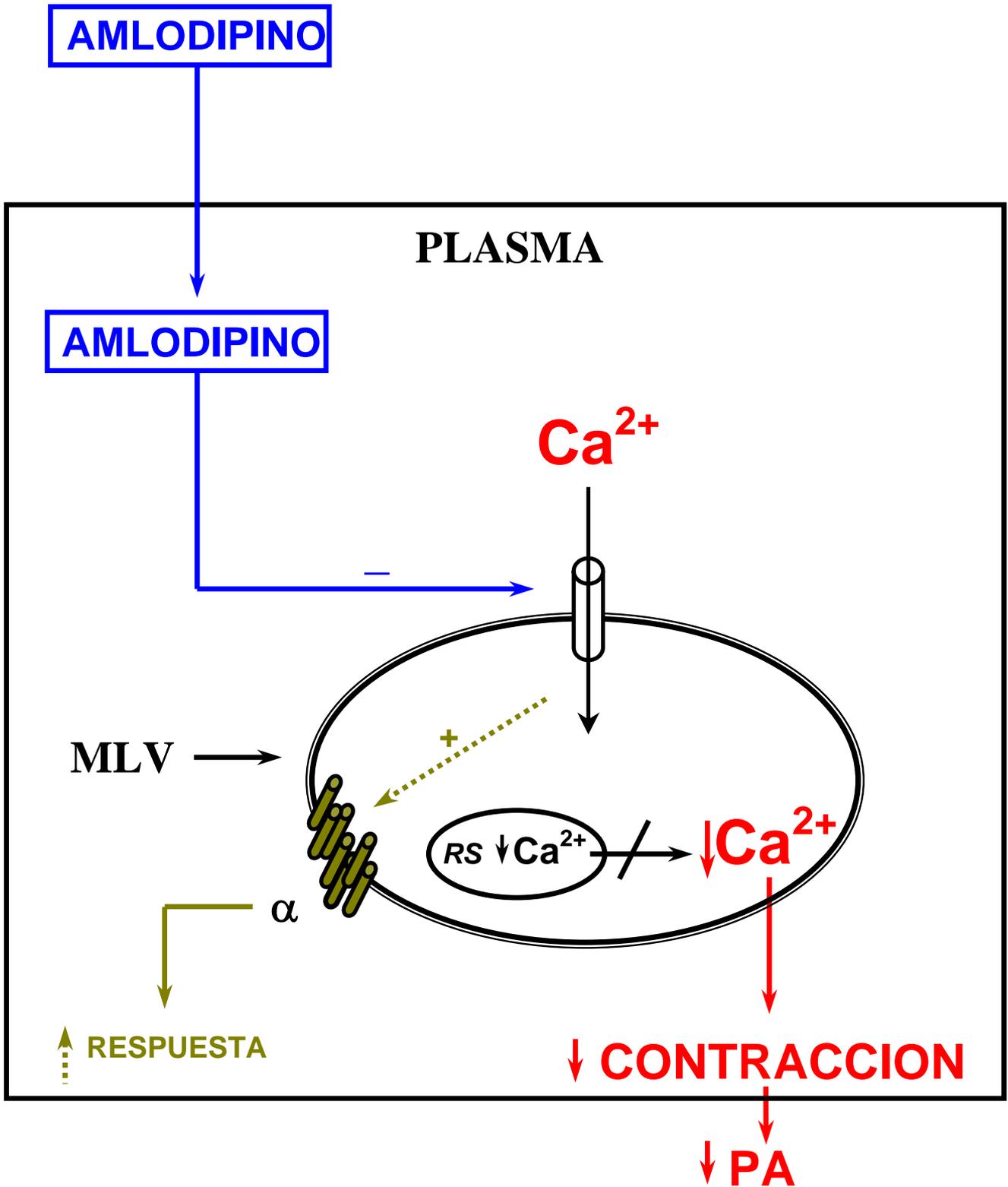


Figura 5D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas que se han tratado durante un período muy prolongado de tiempo con una dosis baja de amlodipino. Se utilizan flechas con líneas discontinuas para indicar procesos compensadores, y también para indicar los cambios que se producen como consecuencia de estos procesos. MLV: miocito liso vascular, RS: retículo sarcoplásmico, PA: presión arterial.

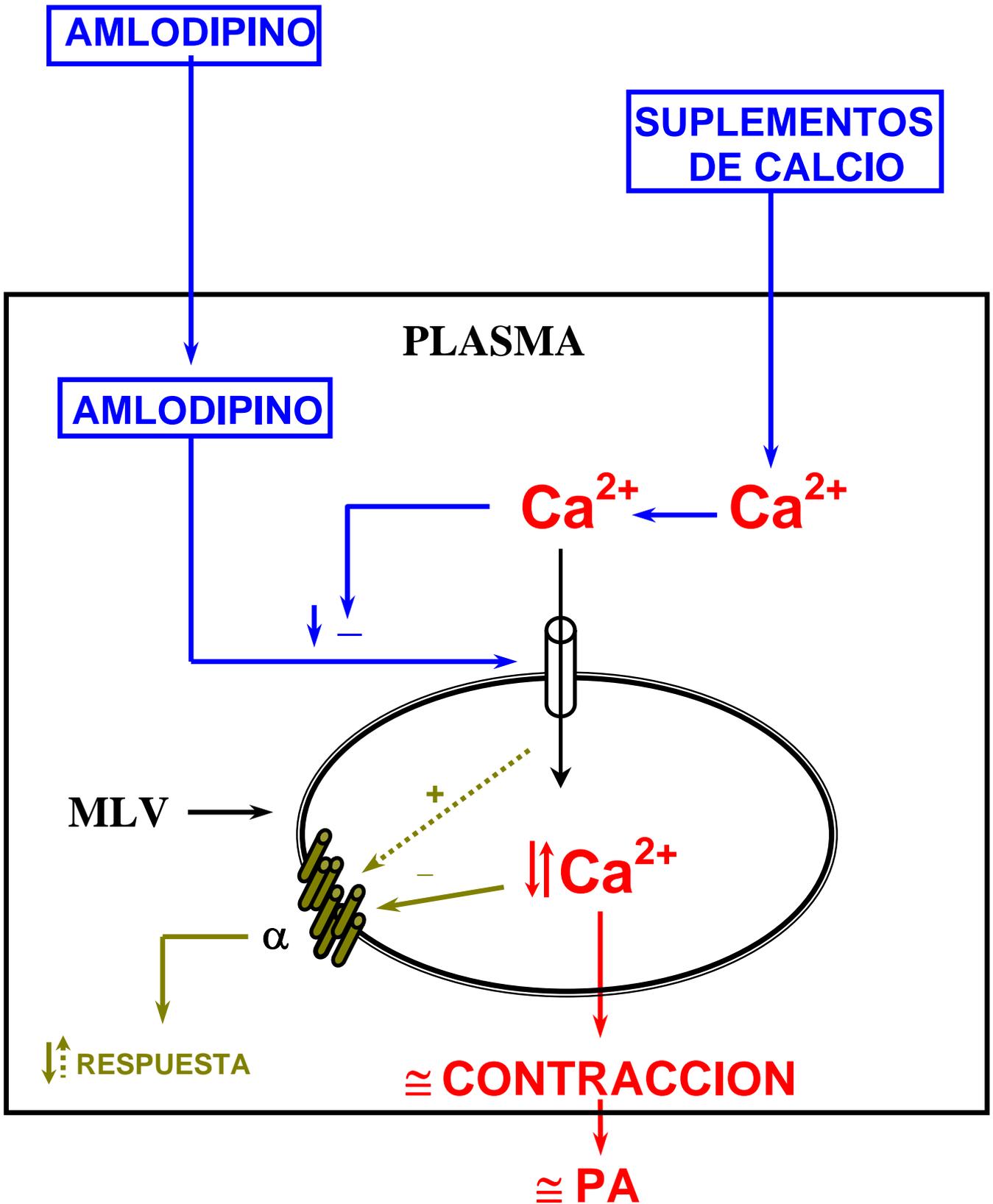


Figura 6D: Esquema de los sucesos que pueden tener lugar en el miocito liso vascular de las ratas espontáneamente hipertensas que se han tratado durante un período muy prolongado de tiempo con suplementos de calcio y con una dosis baja de amlodipino. Se utilizan flechas con líneas discontinuas para indicar procesos compensadores, y también para indicar los cambios que se producen como consecuencia de estos procesos. MLV: miocito liso vascular, PA: presión arterial.

6.- CONCLUSIONES

Con las limitaciones que tiene siempre la extrapolación de los resultados obtenidos en animales a la práctica clínica, el trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1) Los suplementos dietéticos de calcio corrigen la calcemia y controlan la presión arterial de los sujetos hipertensos, pero su efecto antihipertensivo es independiente de las modificaciones del desarrollo corporal que pueden aparecer cuando se administran. El tratamiento con calcio dietético además disminuye sobre todo la presión arterial sistólica, y por este motivo podría prevenir el riesgo de complicaciones cardiovasculares y resultar una buena alternativa para el tratamiento de la hipertensión arterial en algunos casos.

2) Los sujetos normotensos tienen usualmente niveles plasmáticos de calcio más altos que los sujetos hipertensos, y probablemente por este motivo los suplementos dietéticos de calcio no modifican su presión arterial.

3) Los suplementos dietéticos de calcio disminuyen la respuesta de los receptores α_1 y α_2 vasculares, y ocasionan por el contrario un aumento compensador en la respuesta vasoconstrictora mediada por otros receptores.

4) La disminución de la respuesta α vasoconstrictora que producen los suplementos dietéticos de calcio, puede favorecer su efecto antihipertensivo. Sin embargo, existen otros mecanismos que también justifican este efecto, y por este motivo, cuando los sujetos hipertensos aumentan la ingesta de calcio, puede observarse una disminución de su presión arterial sin que se aprecien modificaciones en la respuesta de sus receptores α .

5) El tratamiento crónico con un antagonista del calcio puede corregir la calcemia y la presión arterial de los sujetos hipertensos, pero ocasiona en ellos un aumento compensador de la respuesta de los receptores α_1 y α_2 vasculares.

6) Los suplementos dietéticos de calcio y los antagonistas del calcio pueden presentar efectos antihipertensivos sinérgicos, pero esta asociación únicamente resulta beneficiosa cuando la dosis del fármaco no produce un bloqueo importante del canal iónico. Por el contrario, cuando un antagonista del calcio está produciendo una disminución de la presión arterial, la administración simultánea de calcio en la dieta no aumenta la eficacia del fármaco, y acaba en realidad revirtiendo su efecto antihipertensivo.

7.- BIBLIOGRAFIA

- Abernethy DR. Amlodipine: Pharmacokinetic profile of a low-clearance calcium antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S4-S7.
- Adamson P, McWilliam JR, Brammer MJ, Campbell IC. Synaptosomal free $[Ca^{2+}]$ is reduced by clonidine and dynorphin A-(1-13) and increased by idazoxan. *Eur J Pharmacol* 1987 Oct 13; 142(2): 261-266.
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153:586-600.
- Akerman KEO, Holmberg CI, Gee HF, Renvaktar A, Soini S, Kukkonen JP, Nasman J, Enkvist K, Courtney MJ; Jansson C. α_2 adrenergic receptor activation and intracellular Ca^{2+} . In: Lanier, S.M. & Limbird. L.E. (eds). Harwood, Netherlands: Amsterdam, pp 85-93.
- Akiyama K, Sutoo D. Rectifying effect of exercise on hypertension in spontaneously hypertensive rats via a calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain. *Brain Res* 1999 Mar 27; 823(1-2): 154-60.
- Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. Regulation of adenylate cyclase activity in hamster adipocytes. Inhibition by prostaglandins, alpha-adrenergic agonists and nicotinic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980; 312:167-173.
- Aleixandre A, Pintado A, Puerro M. α_2 -Adrenoceptor-mediated contractions in the rabbit aorta treated with BAY K 8644. *Eur J Pharmacol* 1992;221:129-34.
- Aleixandre MA, King AP, Puerro M. Effect of TMB-8 on alpha-adrenoceptor agonist and KCl induced-contractions in isolated rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1993 Jul; 24(4): 921-928.
- Aleixandre, M.A.; Puerro, M.; Pintado, A. A comparison of the effects of TMB-8 and nifedipine on pressor responses to α_1 and α_2 adrenoceptor agonists in pithed rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351: 500-506.
- Aleixandre MA, Ortega A, Civantos B, López-Miranda V. Effect of dietary calcium on aorta responses to KCl and methoxamine in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1998; 124 Proceedings Supplement:123P.
- Allender PS, Cutler JA, Follmann D, Cappuccio FP, Pryer J, Elliott P. Dietary calcium and blood pressure: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Ann Intern Med* 1996; 124:825-831.
- Allgaier C, Feuerstein TJ, Herting G. *N*-ethyl-maleimide (NEM) diminishes α_2 -adrenoceptor mediated effects on noradrenaline release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 333:104-109.
- Ameri A. Inhibition of stimulus-triggered and spontaneous epileptiform activity in rat hippocampal slices by the Aconitum alkaloid mesaconitine. *Eur J Pharmacol* 1998; 342(2-3):183-191.
- American Institute for Nutrition ad Hoc Committee on Animal Nutrition. 1976 Report on Animal Nutrition, 1977. *J Nutr* 107, 1340-1348.
- Amerini S, Mantelli L, Ledda F. Nitric oxide is not involved in the effects induced by non-adrenergic non-cholinergic stimulation and calcitonin gene-related peptide in the rat mesenteric vascular bed. *Neuropeptides* 1993; 25:51-56.
- Andersson KE. α -blockers therapy in benign prostatic hyperplasia: Uroselectivity. In: Proceedings of the 3rd International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BHP), Monaco, 26-28 June 1996. Cockett AKT et al., Scientific Communication International 1996:541-542.
- Andersson SE. Glibenclamide and L-N^G-nitro-arginine methyl ester modulate the ocular and hypotensive effects of calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 1992; 224:89-91.
- Andersson KE. Alpha1-adrenoceptors and bladder function. *Eur Urol* 1999; 36(suppl 1):96-102.

- Ando K, Sato Y, Ono A, Takahashi K, Shimosawa T, Ogata E, Fujita T. Antihypertensive effect of dietary calcium loading in angiotensin II-salt rats. *Am J Physiol* 1991; 261:R1070-R1074.
- Ando A, Ito I, Ogata E, Fujita T. Vasodilating actions of calcitonin gene-related peptide in normal man: Comparison with atrial natriuretic peptide. *Am Heart J* 1992; 123:111-115.
- Angus, J.A, Cocks, T.M., Satoh, K. The α -adrenoceptors on endothelial cells. *Fedn Proc* 1986; 45:2355-2359.
- Arch Jr, Ainsworth AT, Cawthorne MA; Piercy V, Sennith MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 1984; 309:163-165.
- Ariens, E.J., Simonis, A.M. Physiological and pharmacological aspects of adrenergic receptor classification. *Biochem Pharmacol* 1983; 32:1539-1545.
- Armour, J.A. Intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation possess alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Can J Cardiol* 1997; 13(3):277-284.
- Arvola P, Porsti I, Vapaatalo H. Effects of oral calcium supplementation on blood pressure and vascular smooth muscle relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1990; 183(4):1314.
- Arvola P, Ruskoaho H, Porsti I. Effects of high calcium diet on arterial smooth muscle function and electrolyte balance in mineralcorticoid-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1993b; 108:948-958.
- Ashida T, Kawano Y, Yoshimi H, Kuramochi M, Omae T. Effects of dietary salt on sodium-calcium exchange and ATP-driven calcium pump in arterial smooth muscle of Dahl rats. *J Hypertens* 1992; 10:1335-1341.
- Atlas D, Sabol SL. Interaction of clonidine and clonidine analogues with alpha-adrenergic receptors of neuroblastoma X glioma hybrid cells and rat brain: comparison of ligand binding with inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1981 Jan; 113(3): 521-529.
- Bacq, Z.M., Frederico, H. Action adrenolytique d'un derive de dioxane (933F). *Comptes Rendues Societe Belge de Biologie* 1934; 117:806-808.
- Barbagallo M, Resnick LM, Sosa RE, Corbett ML, Laragh JH. Renal divalent cation excretion in secondary hypertension. *Clin Sci Colch* 1992 Nov; 83(5):561-565.
- Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ. Relation between the parathyroid glands and arterial pressure: is there a parathyroid hypertensive factor?. *Presse Med* 1995; 24:1703-1706.
- Beeley LJ, Berge JM, Chapman H, Hieble P, Kelly J, Naselsky DP, Rockell CM, Young PW. Synthesis of a selective alpha-2A adrenoceptor antagonist, BRL 48962, and its characterization at cloned human alpha-adrenoceptors. *Bioorg Med Chem* 1995 Dec; 3(12): 1693-1698.
- Belizan JM, Pineda O, Sainz E, Menéndez LA, Villar J. Rise of blood pressure in calcium-deprived pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141:163-169.
- Benfey, B.G. Function of myocardial α -adrenoceptors. *Life Science* 1982; 31:101-112.
- Benishin CG, Lewanczuk RZ, Shan JJ, Pang PK. Parathyroid hypertensive factor secretion from subcultured spontaneously hypertensive rat parathyroid cells. *Am J Hypertens* 1999 Dec; 12(12 Pt 1-2): 1260-1263.
- Benishin CG, Lewanczuk RZ, Pang PK. Purification of parathyroid hypertensive factor from plasma of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6372-6376.
- Bernier S, Guillemette G. Increased inositol 1,4,5-trisphosphate binding capacity in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1993 Mar; 6(3 Pt 1): 217-225.

- Berridge MJ. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* 1983; 212:849-858.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984; 220:345-360.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361:315-325.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341:197-205.
- Berthelot A, Gairard A. Parathyroid hormone-desoxycortisone acetate induced hypertension in rat. *Clin Sci* 1980; 58:365-371.
- Berthelsen, S.; Pettinger, W.A. A functional basis for the classification of α -adrenoceptors. *Life Sci* 1977; 21:595-606.
- Bevan, J.A., Bevan, R.D., Hwa, J.J., Owen, M.P., Tayo, F.M. Calcium Regulation in vascular smooth muscle: is there a pattern to its variability within the arterial tree?. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8(Suppl 8):S71-S75.
- Bevan JA, Joyce EH. Calcium dependence of flow-induced dilation. Cooperative interaction with sodium. *Hypertension* 1993 Jan; 21(1):16-21.
- Bian K, Ishibashi K, Bukoski RD. 1,25(OH)₂D₃ modulates intracellular Ca²⁺ and force generation in resistance arteries. *Am J Physiol* 1996 Jan; 270(1 Pt 2): H230-H237.
- Bindels RJ, van den Broek LA, Jongen MJ, Hackeng WH, Lowik CW, van Os CH. Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflügers Arch* 1987 Apr; 408(4):395-400. -
- Birkett NJ. Comments on a meta-analysis of the relation between dietary calcium intake and blood pressure [comment] [see comments]. *Am-J-Epidemiol.* 1998 Aug 1; 148(3): 223-8; discussion 232-3.
- Blakeborough P, Neville SG, Rolls BA. The effect of diets adequate and deficient in calcium on blood pressures and the activities of intestinal and kidney plasma membrane enzymes in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 1990; 63:65-78.
- Blank JL; Brattain KA; Exton JH. Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein beta gamma subunits. *J-Biol-Chem.* 1992 Nov 15; 267(32): 23069-23075.
- Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and hypothesis. *Am J Physiol* 1977; 232:C165-C173.
- Blaxall, H.S.; Murphy, T.J.; Baker, J.C.; Ray, C.; Bylund, D.B. Characterization of the alpha-2C adrenergic receptor subtype in the opossum kidney and in the OK cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 2559:323-329.
- Boer, R., Grassegger, A., Schudt, C.H., Glossman, H. (+)-Niguldipine binds with very high affinity to Ca²⁺ channels and to a subtype of α_1 -adrenoceptors. *Eur J pharmacol* 1989; 172:131-145.
- Bogden-JD; Kemp-FW; Han-S; Murphy-M; Fraiman-M; Czerniach-D; Flynn-CJ; Banua-ML; Scimone-A; Castrovillo-L; et-al Dietary calcium and lead interact to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation. *J-Nutr.* 1995 Apr; 125(4): 990-1002.
- Bogin E, Massry SG, Harary I. Effect of parathyroid hormone on rat heart cells. *J Clin Invest* 1981; 67:1215-1227.
- Bogin E, Massry SG, Levi J, Djaldeti M, Bristol G, Smith J. Effect of parathyroid hormone on osmotic fragility of human erythrocytes. *J Clin Invest* 1982; 9:1017-1025.

- Bohmann C; Schollmeyer P, Rump LC. α_2 -Autoreceptor subclassification in rat isolated kidney by use of short trains of electrical stimulation. *Br J Pharmacol* 1993; 108:262-268.
- Bohr DF. Vascular smooth muscle: dual effect of calcium. *Science* 1963; 139:597-599.
- Bognar TI, Baretta R, Fischer S, Veldet C, Fuder H. Alpha-adrenoceptor mediated facilitation of acetylcholine release in rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254:702-710.
- Bolli P, Erne P, Ji BH, Block LH, Kiowski W, Bühler FR. Adrenaline induces vasoconstriction through post-junctional α_2 adrenoceptors and this response is enhanced in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1984; 2(Suppl 3):115-118.
- Bolli P, Erne P, Kiowski W. Important contribution of post-junctional alpha-2 adrenoceptor mediated vasoconstriction to arteriolar tone in man. *J Hypertens* 1983; 1(Suppl 2):257-259.b
- Bond RA, Clarke DE. Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br J pharmacol* 1988; 95:723-734.
- Borle AB. Calcium metabolism in HeLa cells and the effect of parathyroid hormone. *J Cell Biol* 1968; 36:567-582.
- Borton M, Docherty JR. The effects of ageing on prejunctional 5-hydroxytryptamine receptors in the rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 342:130-135.
- Bou J, Massingham R. Effect of diltiazem upon contractile responses to phenylephrine, cirazoline, Sgd 101/75, ST 587 and B-HT 920 in rabbit aorta and dog saphenous vein preparations. *Eur J Pharmacol* 1986; 121:319-325.
- Bouet Alard R, Mhaouty Kodja S, Limon Boulez Y, Coudouel N, Maltier JP, Legrand C. Heterogeneity of alpha 2-adrenoceptors in human and rat myometrium and differential expression during pregnancy. *Br J Pharmacol* 1997; 122(8):1732-1738.
- Bousquet P, Bruban V, Chann S, Grenay H, Ehrhardt JD, Dontenwill M, Feldman J. Participation of imidazoline receptors and alpha(2)-adrenoceptors in the central hypotensive effects of imidazoline-like drugs. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 881:272-278.
- Boyer-JL; Cardenas-C; Posadas-C; Garcia-Sainz-JA. "Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure produced by alpha 2-adrenergic agonists". *Life Sci* 1983 Dec 26; 33(26):2627-2633.
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR; MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313:54-56.
- Bramich NJ, Hirst GD. Sympathetic neuroeffector transmission in the rat anococcygeus muscle. *J Physiol Lond* 1999; 516(Pt 1):101-105.
- Broadley, K.J., Williamson, K.L., Roach, A.G. In vivo demonstration of alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropy in pithed rats: evidence that noradrenaline does not stimulate myocardial alpha-adrenoceptors. *J Auton Pharmac* 1999; 19(1):55-63.
- Brodde OE: Density and affinity of α -adrenoceptors in normal subjects and hypertensive patients. In: Hayduk K, Bock KD, eds. Central blood pressure regulation: the role of α_2 -receptor stimulation. Clonidine-Workshop, Essen 1982, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 1983.
- Brown, D.A., Caufield, M.P. Hyperpolarizing alpha2-adrenoceptors in rat sympathetic ganglia. *Br J Pharmacol* 1979; 65(3):435-445.
- Brown GL, Gillespie JS. The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J Physiol* 1957; 138:81-102.
- Brown MJ, Macquin Y?. Is adrenaline the cause of essential hypertension? *Lancet* 1981; 2:1079-1082.

- Bühler FR, Amann FW, Bolli P, Hulthen L, Kiowski W, Landmann R, Burgisser E. Elevated adrenaline and increased α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:S134-S138.
- Bukoski RD, Xue H. On the vascular inotropic action of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Am J Hypertens* 1993; 6:388-396.
- Bukoski RD, Xue H, McCarron DA. Effect of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ and ionized Ca²⁺ on ⁴⁵Ca uptake by primary cultures of aortic myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto normotensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146:1330-1335.
- Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 1973; 34:79.
- Burges-RA. The pharmacological profile of amlodipine in relation to ischaemic heart disease.*
- Burges-RA. Review of the pharmacology of amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20(Suppl A):S1-S5.
- Burges RA, Dodd MG. Amlodipine. *Cardiovasc Drug* 1990; 8:25-44.
- Burt RP, Chapple CR, Marshall I. Evidence for a functional α_{1A} -(α_{1C} -) adrenoceptor mediating contraction of rat epididymal vas deferens and an α_{1B} -adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *Br J Pharmacol* 1995; 115:467-475.
- Burt RP, Chapple CR, Marshall I. The role of diacylglycerol and activation of protein kinase C in alpha 1A-adrenoceptor-mediated contraction to noradrenaline of rat isolated epididymal vas deferens. *Br J Pharmacol* 1996 Jan; 117(1): 224-230.
- Burt, R.P., Chapple, C.R., Marshall, I. α_{1A} -Adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens and the involvement of ryanodine stores and Ca²⁺ influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *Br J Pharmacol* 1998; 123:317-325.
- Butler TV, Cameron J, Kirchner KA. Dietary calcium supplementation restores pressure natriuresis responses in Dahl-S rats. *Am-J-Hypertens.* 1995 Jun; 8(6): 615-21.
- Bylund DB. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 22:835-843.
- Bylund DB. Alpha-2 adrenergic receptors: a historical perspective. In *The Alpha-2 Adrenergic Receptors* (Limbird, L., de) 1988a; pp. 1-13, Humana, Clifton, N. J.
- Bylund DB. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* 1988b; 9:356-361.
- Bylund DB. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Jul 12; 763:1-7.
- Bylund, D.B.; Ray-Prenger, C. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251:640-644.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Heiblike, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R. Trendelenburg, U., 1994 IV International Union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46:121-136.
- Bylund, D.B.; Ray-Prenger, C.; Murphy, T.J. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245:600-607.

- Bylund DB, Regan JW, Faber JE, Hieble JP, Triggle CR, Ruffolo RR Jr. Vascular alpha-adrenoceptors: from the gene to the human. *Can J Physiol Pharmacol* 1995 May; 73(5):533-5. .
- Cabrera C, Bohr D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Jan 5; 206(1): 77-81.
- Cabrera CL, Bealer SL, Bohr DF. Central depressor action of nitric oxide is deficient in genetic hypertension. *Am J Hypertens* 1996 Mar; 9(3): 237-41.
- Caine M. The present role of α -adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hypertrophy. *J urol* 1986; 175:1-4.
- Caine, M. Alpha-adrenergic blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 1990; 17:641-649.
- Caine M, Pfau A, Pelberg S. The use of alpha-adrenergic blockers in benign prostatic obstruction. *Br J Urol* 1976; 48:255-263.
- Caine M, Raz S, Ziegler M. Adrenergic and cholinergic receptors in the human prostate, prostatic capsule and bladder neck. *Br J Urol* 1975; 47:193-202.
- Campbell MD, Deth RC, Payne RA, Honeyman TW. Phosphoinositide hydrolysis is correlated with agonist-induced calcium flux and contraction in the rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1985; 116:129-136.
- Cannon, W.B., Rosenblueth, A. *Autonomic Neuro-effector systems*. The Macmillan company, 1937.
- Capuccio FP, Markandu ND, Singer DR, Smith SJ, Shore AC, McGregor GA. Does oral calcium supplementation lower high blood pressure? A double blind study. *J Hypertens* 1987; 5:67-71.
- Carter RJ, Shuster S. The association between the melanocyte-stimulating hormone receptor and the alpha 2-adrenoceptor on the *Anolis melanophore*. *Br J Pharmacol* 1982; 75:169-176.
- Casteels R. Electro- and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Chest* 1978; 78:150-156.
- Catterall-WA; Seagar-MJ; Takahashi-M; Nunoki-K. Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 560:1-14.
- Cauvin C, Malik S. 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* 1984; 230:413-418.
- Cauvin C, Van Breemen C. Different Ca^{2+} channels along the arterial tree. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7(Suppl 4):S4-S10.
- Cauvin C, Saida K, Van Breemen C. Extracellular Ca dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels. *Blood Vessels* 1984; 21:23-31.
- Chabre O, Conklin BR, Brandon S, Bourne HR, Limbird LE. Coupling of the α_{2A} -adrenergic receptor to multiple G proteins: A simple approach for estimating receptor G-protein coupling efficiency in a transient expression system. *J Biol Chem* 1994; 269:5730-5734.
- Chalderberg SC, Duda T, Rhine JA, Sharma RK. Molecular cloning, sequencing and expression of an α_2 -adrenergic receptor complementary DNA from rat brain. *Mol Cell Biochem* 1990; 97:161-172.
- Chalmers JP. Brain amines and models of experimental hypertension. *Circ Res* 1975; Apr; 36(4):469-480.
- Chance WT. Clonidine analgesia: tolerance and cross-tolerance to autoanalgesia. *Life Sci* 1983; 33:2241-2246.

- Channick BJ Adlin EV, Marks AD, Denenberg BS, McDonough MT, Chakko CS, Spann JF. Hyperthyroidism and mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 1981 Aug 27; 305(9):497-500.
- Chaudhuri SK. Dietetic deficiency in toxemia of pregnancy. *Indian Pract* 1969; 22:131.
- Chausmer AB, Sherman BS, Wallach S. The effect of parathyroid hormone on hepatic cell transport of calcium. *Endocrinology* 1972; 90:663-672.
- Chen CJ, Vyas SJ, Eichberg J, Lokhandwala MF. Diminished phospholipase C activation by dopamine in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992 Jan; 19(1): 102-108.
- Chess-Williams R, Chapple CR, Verfurth F, Noble AJ, Couldwell CJ, Michel MC. The effects of SB 216469, an antagonist prostatic α_1 -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1093-1100.
- Cheung DW. An electrophysiological study of alpha-adrenoceptor mediated excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rat saphenous vein. *Br J Pharmacol* 1985a Jan; 84(1): 265-271.
- Cheung DW. The effect of Bay K 8644 on contraction mediated by alpha-adrenoceptors in the rat saphenous vein. *Br J Pharmacol* 1985b Jun; 85(2): 317-319.
- Civantos B, López-Miranda V, Ortega A, Aleixandre MA. Alpha-pressor responses in pithed rats fed on a high calcium diet. *Br J Pharmacol* 1998; 124 Proceedings Supplement:116P.
- Civantos B, López-Miranda V, Ortega A, Aleixandre MA. Alpha-adrenoceptor-mediated pressor responses in pithed rats fed on diets with a different calcium content. *Eur J Pharmacol* 1999; 382:91-101.
- Clare KA, Scrutton MC, Thompson NT. Effects of alpha 2-adrenoceptor agonists and of related compounds on aggregation of, and on adenylate cyclase activity in, human platelets. *Br J Pharmacol* 1984 Jun; 82(2):467-476
- Coca A, De la Sierra A. Flujos catiónicos en la hipertensión arterial esencial. *Hipertensión* 1990; 7:50-67.
- Coca-A; Picado-MJ; De-la-Sierra-A; Aguilera-MT; Sanchez-M; Lluch-MM; Urbano-Marquez-A Comparative evaluation of the antihypertensive efficacy of once-daily amlodipine versus nitrendipine with 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in essential hypertension. *J-Cardiovasc-Pharmacol.* 1993 Oct; 22(4): 513-8.
- Cock TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 1983; 305:627-630.
- Cockett ATK, Aso Y, Denis L, Khoury S, Barry M, Carlton CE et al., Recommendations of the International Consensus Committee concerning: 4. BHP treatment recommendations. In: Proceedings of the International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BHP), Paris, 27-30 June 1993. Cockett ATK et al., *Scientific Communication International* 1993:563-564.
- Cooke, J.P., Rimele, T., Flavahan, N.A., Vanhoutte, P.M. Nimodipine and inhibition of α -adrenergic stimulation of the isolated canine saphenous vein exposed to phenoxybenzamine. *Eur J Pharmacol* 1985; 234:598-602.
- Corr, B., Shayman, J.A., Kramer, J.B., Kipnis, R.J. Increased alpha-adrenergic receptors in flow and adrenergic blockade on plasma renin activity in the cat. *J Physiol* 1981; 67:1232-1236.
- Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Multiple second messenger pathways of α -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1990; 265:63-69.
- Crass MF 3d, Moore PL, Strickland ML, Pang PK, Citak MS. Cardiovascular responses to parathyroid hormone. *Am J Physiol* 1985 Aug; 249(2 Pt 1): E187-E194.

- Cullen LK, Reynoldson JA. Central and peripheral alpha-adrenoceptor actions of amitraz in the dog. *J Vet Pharmacol Ther* 1990 Mar; 13(1): 86-92.
- Curro, F.A., Greenberg, S. Characteristics of postsynaptic alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors in canine vascular smooth muscle 1983; *Can J Physiol Pharmacol* 61:893-904.
- Cutter, W.E., Bier, D.M., Shah, S.D., Cryer, P.E. Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man. *J Clin Invest* 1980; 66:94-101.
- Coca-A; Picado-MJ; De-la-Sierra-A; Aguilera-MT; Sanchez-M; Lluch-MM; Urbano-Marquez-A -Cheng, H.C., Gleason, E.M., Nathan, B.A., Lachman, P.J., Woodward, J.K. Effects of clonidine on gastric secretion in the rat. *J pharmacol Exp ther* 1981; 217:121-126.
- Clarke DE, Ford APDW, Williams TJ, Bonhaus D, Vimont R, Blue DRJr. Pharmacological evidence for the equivalency of the α_{1A} -adrenoceptor of rat and the cloned bovine α_{1C} -adrenoceptor a revised α_1 -adrenoceptor classification scheme. *Pharmacol Commun* 1995; 6:9-14.
- Daly CJ, Cotecchia S, McGrath JC. Low frequency electrical field stimulation elicits responses in segments of mouse tail artery which are slower in alpha1B-knockout mouse than in control mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358:R600.
- Daly CJ; Dunn WR; McGrath JC; Miller DJ; Wilson VG. An examination of the sources of calcium for contractions mediated by postjunctional alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in several blood vessels isolated from the rabbit. *Br J Pharmacol* 1990 Feb; 99(2): 253-260.
- Daniel EE, Brown RD, Wang YF, Low AM, Lu-Chao H, Kwan CY. Alpha-adrenoceptors in canine mesenteric artery are predominantly 1A subtype: pharmacological and immunohistochemical evidence. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(2):671-679.
- Daniel EE, Gaspar V, Berezin Y, Kwan CY. Characterization of alpha2 adrenoceptors and other adrenoceptors in membranes isolated from dog mesenteric nerve axons. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:978-986.
- Dashwood MR, Gilbey MP, Spyer KM. The localization of adrenoceptors and opiate receptors in regions of the cat nervous system involved in cardiovascular control. *Neuroscience* 1985; 15:537-551.
- Dashwood MR, Spyer KM. Autoradiographic localization of alpha-adrenoceptors, muscarinic acetylcholine receptors and opiate receptors in the heart. *Eur J Pharmacol* 1986 Aug 15; 127(3): 279-82.
- Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ. On the role of endogenous G-protein β subunits in N-type Ca^{2+} current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 1998; 506:319-329.
- De Langen CD, Mulder AH. On the role of calcium ions in the presynaptic alpha-receptor mediated inhibition of [3H]noradrenaline release from rat brain cortex synaptosomes. *Brain Res* 1980 Mar 10; 185(2):399-408.
- De Jonge A, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Participation of cardiac presynaptic α_2 -adrenoceptors in the bradycardic effects of clonidine and analogs. *Naunyn-Schmiedbergs Arch Pharmacol* 1981; 317:87-12.
- De Jonge A, Santing PN, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Functional role of cardiac presynaptic alpha 2-adrenoceptors in the bradycardia of alpha-adrenoceptor agonists in pentobarbitone- and urethane-anaesthetized normotensive rats. *J Auton Pharmacol* 1982; 2:87-96.
- De Mey, J., Vanhoutte, P.M. Uneven distribution of postjunctional alpha-1 and alpha-2 like adrenoceptors in canine arterial and venous smooth muscle. *Circulation Res* 1981; 48:875-884.
- De Moraes, S., Bento, A.C., De Lima, W.T. Responsiveness of epinephrine in adult spontaneously hypertensive rat tail artery: preferential mediation by postjunctional α_2 -adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 11:473-477.

- Demontis MP, Varoni MV, Volpe AR, Emanuelli C, Madeddu P. Role of nitric oxide synthase inhibition in the acute hypertensive response to intracerebroventricular cadmium. *Br J Pharmacol* 1998 Jan; 123(1): 129-35.
- Dietz R, Schömig A, Haebara H, Mann JFE, Rascher W, Lüth JB, Grünherz N, Gross F. Studies on the pathogenesis of spontaneous hypertension of rats. *Circ Res* 1978; 43:198-1106.
- Dipette DJ, Greulich PE, Kerr NE, Graham GA, Holland OB. Systemic and regional hemodynamic effects of dietary calcium supplementation in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 1989; 13:77-82.
- Dipette DJ, Greulich PE, Nickols GA, Graham GA, Green A, Cooper C, Holland OB. Effect of dietary calcium supplementation on the blood pressure and parameters of calcium homeostasis in mineralocorticoid-salt hypertension. *Am J Hypertens* 1990; 8:515-520.
- DiPette DJ, Westlund KN, Holland OB. Dietary calcium modulates spinal cord content of calcitonin gene-related peptide in the rat. *Neurosci Lett* 1988 Dec 19; 95(1-3): 335-340.
- DiPette DJ, Christenson W, Nickols MA, Nickols GA. Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in genetic hypertension. *Endocrinology* 1992 Apr; 130(4): 2045-2051.
- DiPette DJ, Schwarzenberger K, Holland OB. Systemic and regional hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide. *Hypertension* 1987 Jun; 9(6 Pt 2): III142-46
- Dixon RAF, Sigal IS, Candelone MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD. Structural features required for ligand binding to the β -adrenergic receptor. *EMBO J* 1987; 6:3269-3275.
- Docherty JR. An investigation of presynaptic α -adrenoceptor subtypes in the pithed rat heart. *Br J Pharmacol* 1983a; 78:655-657.
- Docherty JR. An examination of presynaptic α -adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 1983b; 80:510P.
- Docherty JR. The effects of ageing on vascular alpha-adrenoceptors in pithed rat and rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1988; 146:1-5.
- Docherty, J.R. The pharmacology of α_1 - and α_2 -adrenoceptors: evidence for and against a further subdivision. *Pharmacol Ther* 1989; 44:241.
- Docherty JR. Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol Rev* 1990a; 42:103-125.
- Docherty JR. No effect of pertussis toxin on peripheral prejunctional alpha-2 adrenoceptor mediated responses and on endothelium-dependent relaxations in the rat. *Br J pharmacol* 1990b; 100:348-352.
- Docherty JR. Effect of ageing on the vasoconstrictor responses to noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in the human saphenous vein. *Cardiol Elderly* 1993; 1:327-330.
- Docherty JR. Investigations of the subtype of α_1 -adrenoceptor in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998a; 358:R612.
- Docherty JR. Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1998b; 361:1-15.
- Docherty, J.R., Constantine, J.W., Starke, K. Smooth muscle of rabbit aorta contains alpha-1 but not alpha-2 adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981; 317:5-7.
- Docherty JR, McGrath JC. A comparison of pre- and post-junctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of the rat. Evidence for two types of post-junctional alpha-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1980a;312:107-116.

- Docherty JR, McGrath JC. An examination of factors influencing adrenergic transmission in the pithed rat, with special reference to noradrenaline uptake mechanisms and post-junctional alpha-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1980b;313:101-111.
- Docherty JR, Starke K. Postsynaptic alpha-adrenoceptor subtypes in rabbit blood vessels and rat anococcygeus muscle studied in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 1981; 3:854?
- Dohlman, H.G., Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 1987; 26:2657-2664.
- Donati-L; Buhler-FR; Beretta-Piccoli-C; Kusch-F; Heinen-G. Antihypertensive mechanism of amlodipine in essential hypertension: role of pressor reactivity to norepinephrine and angiotensin II. *Clin-Pharmacol-Ther.* 1992 Jul; 52(1): 50-9.
- Doxey, J.C., Roach, A.G. Presynaptic alpha-adrenoceptors; in vitro methods and preparations utilised in the evaluation of agonists and antagonists. *J Auton Pharmacol* 1980; 1(1):73-99.
- Doxey, J.C., Smith. C.F.C., Walker, J.M. Selectivity of blocking agents for pre- and postsynaptic alpha-adrenoceptors. *Brit J Pharmacol* 1977; 60(1):91-96.
- Drew, G.M. Pharmacological characterization of the presynaptic alpha-adrenoceptors regulating cholinergic activity in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1978; 64:293-300.
- Drew, G.M. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonist on pre- and postsynaptically located alpha-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1976; 36:313-320.
- Drew, G.M. Pharmacological characterization of the presynaptic alpha-adrenoceptor in the rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 1977; 42(2):123-130.
- Drew, G.M., Whiting, S.B. Evidence for two distinct types of postsynaptic α -adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo. *Br J Pharmacol* 1979; 67:207-215.
- Dubocovich M, Langer SZ. Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking pre- and postsynaptic adrenergic receptors. *J Physiol* 1974; 237:505-519.
- Durkin H, Ollerenshaw JD, Heagerty AM. Resistance artery phosphoinositide metabolism in genetic hypertension. *J Hypertens* 1990 Jun; 8(6): 557-563.
- Duzic E, Coupry I, Downing S, Lanier SM. Factors determining the specificity of signal transduction by guanine nucleotide-binding protein-coupled receptors. I. Coupling of alpha 2-adrenergic receptor subtypes to distinct G-proteins. *J Biol Chem.* 1992 May 15;267(14):9844-51.
- Eckhart AD, Zhiming Z, Arendshort WJ, Faber JE. Oxygen modulates α_{1B} -adrenergic receptor gene expression by arterial but not venous vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 271 (Heart Circ Physiol 40) 1996; : H1599-H1608.
- Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C. Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett* 1985; 58:213-217.
- Edwards RM, Stack EJ, Trizna W. Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and relaxes intracerebral arterioles. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257:1020-1024.
- Eltze M. Functional evidence for an alpha 1B-adrenoceptor mediating contraction of the mouse spleen. *Eur J Pharmacol* 1996a; 311:187-198.
- Eltze M. In functional experiments, risperidone is selective, not for the B, but for the A subtype of alpha-1 adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* 1996b; 295:69-73.

- Endoh M. Cardiac α_1 -adrenoceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neurochem research* 1996; 21(2):217-229.
- Engberg G, Elam M, Svensson TH. Clonidine withdrawal: activation of brain noradrenergic neurons with specifically reduced α_2 -receptor sensitivity. *Life Sci* 1982; 30:235-243.
- Errasti AE, Velo MP, Torres RM, Sardi SP, Rothlin RP. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br J Pharmacol* 1999; 126(2):437-442.
- Ezimokhai M, Osman N. The effect of sodium based hypo-osmolality on arterial smooth muscle reactivity in vitro. *Res Exp Med Berl* 1998; 197(5): 269-279.
- Exton JH. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and others agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:481-509.
- Fagura MS, Lydford SJ, Duggall IG. Pharmacological classification of α_1 -adrenoceptors mediating contractions of rabbit isolated ear artery: comparison with rat isolated thoracic aorta. *Br J pharmacol* 1997; 120:247-258.
- Fain-JN; Garcia-Sainz-JA. Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and of adenylate cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines. *Life Sci* 1980 Apr 14; 26(15):1183-1194.
- Fan J. [A preliminary study on the cellular mechanism of hypotensive effect of high calcium diet in spontaneously hypertensive rats] *Chung Hua Hsin Hsueh Kuan Ping Tsa Chih* 1991; 19(5):322-324, 332.
- Fasolato C, Innocenti B, Pozzani T. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:77-83.
- Faure, C., Gouhier, C., Langer, S.Z., Graham, D. Quantification of α_1 -adrenoceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213:935-943.
- Feng Q, Sun X, Lu X, Edvinsson L, Hedner T. Decreased responsiveness of vascular postjunctional α_1 -, α_2 -adrenoceptors and neuropeptide Y1 receptors in rats with heart failure. *Acta Physiol Scand* 1999 Aug; 166(4):285-291.
- Feuvrier E, Aubert M, Mausset AL, Alonso G, Gaillet S, Malaval F, Szafarczyk A. Glucocorticoids provoke a shift from α_2 - to α_1 -adrenoceptor activities in cultured hypothalamic slices leading to opposite noradrenaline effect on corticotropin-releasing hormone release. *J Neurochem* 1998 Mar; 70(3):1199-1209.
- Fielding S, Wilker J, Hynes M, Szewczak M, Novick WJ, Lal H. A comparison of clonidine with morphine for antinociceptive and antiwithdrawal actions. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 207:899-905.
- Fiscus RR, Zhou HL, Wang X, Han C, Ali S, Joyce CD, Murad F. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-induced cyclic AMP, cyclic GMP and vasorelaxant responses in rat thoracic aorta are antagonized by blockers of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Neuropeptides* 1991; 20:133-143.
- Flavahan, N.A., Miller, V.M., Aarhus, L.L., Vanhoutte, P.M. Denervation augments α_2 but not α_1 adrenergic responses in canine saphenous veins. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240:589-593.
- Flavahan, N.A., Vanhoutte, P.M. α_1 and α_2 adrenoceptor: response coupling in canine saphenous and femoral veins. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238(1):131-138.
- Flavahan NA, Hales MA, Aleskowitz TD, Gaine SP Vanhoutte PM. α_1 -adrenoceptors in canine pulmonary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32(2):308-316.
- Fliser D, Franek E, Fode P, Stefanski A, Schmitt CP, Lyons M, Ritz E. Subacute infusion of physiological doses of parathyroid hormone raises blood pressure in humans. *Nephrol Dial Transplant* 1997 May; 12(5): 933-938.

- Flordellis CS; Handy DE, Bresnahan MR, Zannis VI, Gavras H. Cloning and expression of a rat brain α_{2B} -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1019-1023.
- Florian JA, Watts SW. Integration of mitogen-activated protein kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Jan; 284(1):346-355.
- Folsom AR, Smith CL, Prineas RJ, Grimm RH Jr. Serum calcium fractions in essential hypertensive and matched normotensive subjects. *Hypertension* 1986 Jan; 8(1):11-15.
- Ford, A.P.D.W., Williams, T.J., Blue, D.R., Clarke, D.E. α_1 -adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:167-170.;
- Ford, A.P.D.W., Arreondo, N.F., Blue, D.R., Bonhsud, D.W., Jasper, J., Kava, M.S., Lesnick, J., Pfister, J.R, Shieh, I.A., Williams, T.J., Mc Neal J.E, Stamey, T.A., Clarke, D.E. RS-17053, a selective α_1 ?-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional α_1 -adrenoceptor in prostate of man: implications for adrenoceptro clasification .*Mol Pharmacol*. In press)
- Ford APDW, Daniels DV, Chang DJ, Gever JR, Jasper JR, Lesnick JD, Clarke DE. Pharmacological pleiotropism of the human recombinant α_{1A} -adrenoceptor: implications for α_1 -adrenoceptor classification. *Br J Pharmacol* 1997; 121:137-1135
- Forder J, Scriabine A, Rasmussen H: Plasma membrane calcium flux, protein kinase C activation and smooth muscle contraction. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 235:267-273.
- Forray C, Bard JA; Wetzel JM, Chiu G, Shapiro E, Tang R, Lepon H, Harting PR, Weinshank RL, Branchek TA, Gluchowski C. The α_1 -adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human α_{1C} subtype. *Mol Pharmacol* 1994; 45:703-708.
- Fowler, P.J., Grous, M., Price. W., Mathews, W.D. Pharmacological differentiation of post-synaptic alpha-adrenoceptors in the dog saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229:712-718.
- Franke RR, Sakmar TP, Graham RM, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domains and transducin. *J Biol Chem* 1992; 267:14764-14774.
- Fraser CM, Arakawa S, McCombie WR, Venter JC. Cloning, sequence analysis and permanent of a human α_2 -adrenergic receptorin Chinese hamster ovary cells: evidence for independent pathways of receptor coupling to adenilate cyclase attenuation and activation. *J Biol Chem* 1989; 264:11754-11761.
- French N. Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mamalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 1995; 68(2):175-208.
- Fujito K, Yokomatsu M, Ishiguro N, Numahata H, Tomino Y, Koide H. Effects of dietary Ca^{2+} on erythrocyte Na^+ -transport systems in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1991; 81:107-112.
- Fukuda K, Kuchii M, Hano T, Mohara O, Miyamoto Y, Nishio I, Masuyama Y. Changes in renal alpha 2-adrenoceptor in experimental hypertension in rats. *Jpn Circ J* 1983 Oct; 47(10): 1221-1226.
- Furchgott, R.F. The pharmacological differentiation of adrenergci receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1967; 139(3):553-570.
- Furspan PB, Rinaldi GJ, Hoffman K, Bohr DF. Dietary calcium and cell membrane abnormality in genetic hypertension. *Hypertension* 1989 Jun; 13(6 Pt 2):727-730.
- Galizky, J., Taouis, M., Berlan, M., Riviere, D., Garrigues, M., Lafontan, M. α_2 -Antagonist compounds and lipid mobilization: evidence for a lipid mobilizing effect of oral yohimbine in healthy male volunteers. *Eur J Clin Invest* 1988; 18:587-594.

- Galloe AM; Gradual N, Moller J, Bro H, Lorgesen M, Christiamen HR. Effect of oral calcium supplementation on blood pressure in patients with previously untreated hypertension: a randomised, a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Hum Hypertens* 1993; 7:43-45.
- Gangula PR, Supowit SC, Wimalawansa SJ, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ, Yallampalli C. Calcitonin gene-related peptide is a depressor in NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension during pregnancy. *Hypertension* 1997 Jan; 29(1 Pt 2): 248-253.
- García-Sainz JA: α_1 -Adrenergic action: receptor subtypes, signal transduction and regulation. *Cell Signal* 1993; 5:539-547.
- Gardiner SM, Compton AM, Bennett T. Regional hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide. *Am J Physiol* 1989 Feb; 256(2 Pt 2): R332-R338
- Gavin K, Docherty JR. Investigation of the subtype of alpha 2-adrenoceptor mediating pressor responses in the pithed rat.. *Eur J Pharmacol* 1996 Dec 27; 318(1):81-87
- Gavin, K.T., Colgan, M.P., Moore, D., Shanik, G., Docherty, J.R. α_{2C} -Adrenoceptors mediate contractile responses to noradrenaline in the human saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 355:406-411
- Geiger-H; Bahner-U; Palkovits-M; Seewaldt-B; Heidland-A. Is the effect of calcium diet or parathyroidectomy on the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats mediated by atrial natriuretic peptide?. *Kidney Int Suppl* 1988 Sep; 25: S93-S97.
- Gellai M, Ruffolo RR Jr. Renal effects of selective α_1 - and α_2 -adrenoceptor agonists in conscious normotensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240:723-728.
- Gesek, F.A. Alpha1- and alpha2-adrenoceptor control of sodium transport reverses in developing hypertension. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2):524-529.
- Gesek FA, Strandhoy JW. Dual interactions between alpha 2-adrenoceptor agonists and the proximal Na(+)-H+ exchanger. *Am J Physiol* 1990 Mar; 258(3 Pt 2): F636-F642.
- Giris SI, MacIntyre I, Macdonald DWR, Lynch C, Morris HR, Wimalawansa SJ, Self CH, Stevenson JC, Bevis PJR. Calcitonin gene-related peptide - potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet* 1985; 2:14-16.
- Glossmann-H; Striessnig-J. Molecular properties of calcium channels. *Rev-Physiol-Biochem-Pharmacol*. 1990; 114: 1-105.
- Godfraind T, Miller RC. Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor stimulation and Ca-fluxes in isolated rat aorta. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1982; 256:171-173.
- Godfraind T, Miller RC, Lima JS. Selective alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonist-induced contractions and ^{45}Ca fluxes in the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1982; 77:597-604.
- Gong G, Dobin A, McArdle S, Sun L, Johnson ML, Pettinger WA. Sex influence on renal alpha 2-adrenergic receptor density in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1994 May; 23(5): 607-612.
- Göthert M. Effects of presynaptic modulators on Ca^{2+} -induced noradrenaline release from cardiac sympathetic nerves. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1977 Nov; 300(3): 267-272.
- Göthert M. Ca^{2+} -induced noradrenaline release from central noradrenergic neurons promoted by high K^+ concentration or ionophore A23187. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1979 May 28; 307(1):29-37.
- Göther, M., Huth, H. Alpha-adrenoceptor-mediated modulation of 5-hydroxytryptamine release from rat brain cortex slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1980; 313:21-26.

- Govier, W.C. A positive inotropic effect of phenylephrine mediated through α -adrenergic receptors. *Life Sci* 1967; 6:1361-1365.
- Govier, W.C. Myocardial α -adrenergic receptors and their role in the production of a positive inotropic effect by sympathomimetic amines. *J Pharmacol Exp Ther* 1968; 159:82-90.
- Graham RM, Pérez DM; Hwa M, Piascik MT. α_1 -Adrenergic receptors subtypes: molecular structure, function and signaling. *Circ Res* 1996; 78:737-749.
- Grant, J.A.; Scrutton, M.C. Novel alpha-2 adrenoceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. *Nature* 1979; 277:659-661.
- Gray DW, Marshall I. Human a-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1992a; 107:691-696.
- Gray DW, Marshall I. Nitric oxide synthesis inhibitors attenuate calcitonin gene-related peptide endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1992b; 212:37-42.
- Green GJ, Wilson H, Yates MS. The mechanism of the clonidine-induced reduction in peripheral parasympathetic submaxillary salivation. *Eur J Pharmacol* 1979; 56:331-336.
- Greenberg DA, Prichard DC, Snyder SH. Alpha-noradrenergic receptor binding in mammalian brain: differential labeling of agonist and antagonist states. *Life Sci* 1976; 19:69-76.
- Greenfield DS, Liebmann JM, Ritch R. Brimodine: a new alpha2-adrenoceptor agonist for glaucoma treatment. *J Glaucom* 1997; 6(4):250-258.
- Griffith-LE; Guyatt-GH; Cook-RJ; Bucher-HC; Cook-DJ. The influence of dietary and nondietary calcium supplementation on blood pressure: an updated metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens* 1999 Jan; 12(1 Pt 1): 84-92.
- Grobbee De, Hofman A. Effect of calcium supplementation on iastolic on diastolic blood pressure in young people with mild hypertension. *Lancet* 1986; 2:703-707.
- Gu H, Trajkovic S, LaBelle EF. Norepinephrine-induced phosphatidylcoline hydrolysis by phospholipases D and C in rta tail artery. *Am J Physiol* 1992; 262:C1376-C1383.
- Guillespie JS, McClaren A, Pollock D. A method of stimulating different segments of autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br J Pharmacol* 1970; 40:257-267.
- Gillespie JS, Muie TC. A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 30:78-87.
- Guild SB, Jenkinson S, Muir TC. The interaction between noradrenaline and ATP upon polyphosphoinositide metabolism and contraction in tail arteries from normo- and hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 1992 Oct; 44(10):836-840.
- Gunnar WB, Frish-Holmberg M. The antihypertensive mechanism of clonidine in man. *Hypertension* 1981; 3:340-346.
- Gupta S, Moreland RB, Yang S, Gallant CM, Goldstein I, Traish A. The expression of functional postsynaptic alpha2-adrenoceptors in the corpus cavernosum smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1998 Mar; 123(6):1237-1245.
- Gurdal H, Seasholtz TM, Wang HY, Brown RD, Johnson MD, Friedman E. Role of G alpha q or G alpha o proteins in alpha 1-adrenoceptor subtype-mediated responses in Fischer 344 rat aorta. *Mol Pharmacol* 1997; 52(6):1064-1070.

- Hagihara M, Nagatsu T, Ohhashi M, Miura T. Concentrations of neopterin and biopterin in serum from patients with rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus and in synovial fluid from patients with rheumatoid or osteoarthritis [letter] *Clin-Chem*. 1990 Apr; 36(4): 705-706.
- Hamada H, Damron DS, Hong SJ, Van Wagoner DR, Murray PA. Phenylephrine-induced Ca oscillations pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 1997; 81(5):812-823.
- Hamlin RHJ. Prevention of preeclampsia. *Lancet* 1962; 1:864.
- Han C, Abel PW, Minneman KP. α_1 -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature* 1987; 329:333-335.
- Han C, Li J, Minneman KP. Subtypes of α_1 -adrenoceptors in rat blood vessels. *Eur J Pharmacol* 1990; 190:97-104.
- Hancock AA; Bukner SA, Knepper S, Brune MA, deBERNARDS Jf, Meyer MD. Pharmacological actions of A-61603, a potent α_1 -adrenergic receptor agonist, selective for α_{1A} and α_{1C} receptors: pharmacology of adrenoceptors. In: Satellite Symposium of the XIIth IUPHAR Congress, King of Prussia. 1994; Pa: July 21-23.
- Hanft G, Gross G. The effect of reserpine, desipramine and thyroid hormone on α_{1a} - and α_{1b} -adrenoceptor binding sites: evidence for a subtype-specific regulation. *Br Pharmacol* 1990; 330:125S-127S.
- Hanna MK, Khairallah PA. Alterations of myocardial alpha 1-adrenergic receptors in hypertensive cardiac hypertrophy in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986 Sep; 283(1): 80-93.
- Hano T, Baba A, Takeda J, Nishio I, Masuyama Y. Antihypertensive effects of oral calcium supplementation in spontaneously hypertensive rats. *Contrib Nephrol* 1991; 90:36-41.
- Hansson L. Clinical aspects of blood pressure crisis due to withdrawal of centrally acting antihypertensive drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15:485S-489S.
- Hansson L, Hunyor SN, Julius S, Hoobler SW. Blood pressure crisis following withdrawal of clonidine with special reference to arterial and urinary catecholamine levels and suggestions for acute management. *Am Heart J* 1973; 85:605-610.
- Harris RA, Carnes DL, Forte LR. Reduction of brain calcium after consumption of diets deficient in calcium or vitamin D. *J Neurochem* 1981; 36:460-466.
- Harrison JK, Pearson WR, Lynch KR. Molecular characterization of α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12:62-67.
- Haslam RJ. Roles of cyclic nucleotides in platelet function. *CIBA Found Symp* 1975; 35:121-151.
- Hatton-DC; Huie-PE; Muntzel-MS; Metz-JA; McCarron-DA. Stress-induced blood pressure responses in SHR: effect of dietary calcium. *Am-J-Physiol*. 1987 Jan; 252(1 Pt 2): R48-54.
- Hatton DC, Muntzel M, Absalon J, Lashley D, McCarron DA. Dietary calcium and iron: effects on blood pressure and hematocrit in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:542-546.
- Hatton DC, Muntzel M, McCarron DA, Pressley M, Bukoski RD. Early effects of dietary calcium on blood pressure, plasma volume, and vascular reactivity. *Kidney Int Suppl* 1988 Sep; 25:S16-S18.
- Hatton DC, Scrogin KE, Metz JA, McCarron DA. Dietary calcium alters blood pressure reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1989 Jun; 13(6 Pt 1): 622-629.
- Hatton DC, Scrogin KE, Levine D, Feller D, McCarron DA. Dietary calcium modulates blood pressure through alpha 1-adrenergic receptors. *Am J Physiol* 1993; 264 (2 Pt 2):F234-F238.

- Hatton DC, Xue H, Demeritt JA, McCarron DA. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ induced alterations in vascular reactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci* 1994; 307:S154-S158.
- Hatton DC, Yue Q, McCarron DA. Mechanisms of calcium's effects on blood pressure. *Semin Nephrol* 1995; 15:593-602.
- Häusler G. Central alpha-adrenoceptors involved in cardiovascular regulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4(Suppl 1):S72-S76.
- Karr-Dullien V, Bloomquist EL, Beringer T, Eli-Bernani AW. Flow-pressure relationships in newborns and infants spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1981; 18:245-252.
- Kawashima H. Parathyroid hormone causes a transient rise in intracellular ionized calcium in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Jan 30; 166(2): 709-714.
- Kishimoto H, Tsumura K, Fijjoka S, Uchimoto S, Morii H. Chronic parathyroid hormone administration reverses the antihypertensive effect of calcium loading in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1993; 6 (3 Pt 1):234-240.
- Hayar A, Guyenet PG. Alpha2-adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition in bulbospinal neurons of rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt2):H1069-H1080.
- Hayashi Y, Chiba K, Matsuoka T, Suzuki-Kusaba M, Yoshida M, Hisa H, Satoh S. Renal nerve stimulation induces alpha2-adrenoceptor mediated antinatriuresis under inhibition of prostaglandin synthesis in anaesthetized dogs. *Tohoku J Exp Med* 1999; 188(4):335-346.
- Haynes JM, Adams GD, Pennefather JN. Alpha 2-adrenoceptors in the guinea-pig uterus: heterogeneity in the circular and longitudinal smooth muscle layers. *Eur J Pharmacol* 1993 Dec 7; 250(2):231-237.
- Haynes JM, Hill SJ. Alpha-adrenoceptor mediated responses of the cauda epididymis of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1996 Nov; 119(6):1203-1210.
- Heagerty-AM; Ollerenshaw-JD; Swales-JD. Abnormal vascular phosphoinositide hydrolysis in the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol* 1986 Dec; 89(4): 803-807.
- Heal DJ, Cheetham SC, Butler SA, Gosden J, Prow MR, Buckett WR. Receptor binding and functional evidence suggest that postsynaptic alpha2-adrenoceptor in rat brain are of the alpha 2D subtype. *Eur J Pharmacol* 1995; 277(2-3):215-221.
- Hein L, Kobilka BK. Clinical and molecular pharmacology of adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358:R575.
- Heller H. Über die zentrale Blutdruckwirkung des Adrenalins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1933; 173:291-300.
- Hellstrom J, Birke G, Edvall CA. Hypertension in hyperparathyroidism. *Br J Urol* 1958; 30:13-24.
- Hermsmeyer K, Hatton DA, Karanja N, McCarron D. Effects of dietary calcium on nimodipine-sensitive calcium channel function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 1990; 21:IV98-IV101.
- Heynen-G. Amlodipine: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of a calcium antagonist with prolonged effect]. *Schweiz-Rundsch-Med-Prax.* 1992 Feb 11; 81(7): 199-203.
- Hieble JP, Woodward DF. Different characteristics of postjunctional alpha-adrenoceptor on arterial and venous smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 328:44-50.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Berstein D, Barsh GS, Hancock AA, Buckner SA, Knepper S, Brune MA, DeBernadus JF,

- Meyer MD. Pharmacological actions of A-61603 a potent α_1 -adrenergic receptor agonist, selective for α_{1A} and α_{1C} receptors: pharmacology of adrenoceptors. In: Satellite Symposium of the XIIth IUPHAR Congress; King of Prussia 1994; PA: July 21-23,
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenberg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR. International Union of Pharmacology, X: Recommendation for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 1995a; 47:267-270.
- Hieble JP; Bondinell WE; Ruffolo RRJr. Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J-Med-Chem.* 1995b; 38(18): 3415-3444.
- Hieble JP, Caine M, Zalaznik E. In vitro characterization of the α -adrenoceptors in human prostate. *Eur J Pharmacol* 1985; 107:111-117.
- Hieble JP; DeMarinis RM; Matthews WD. Evidence for and against heterogeneity of alpha 1-adrenoceptors. *Life Sci.* 1986 Apr 14; 38(15): 1339-1350.
- Hieble JP, Sarau HM, Foley JJ, DeMarinis RM, Pendleton RG. Comparison of central and peripheral alpha 1-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982; 318:267-273.
- Hiramatsu YR, Kigoshi S, Muramatsu I. Identification of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat lung by binding of [³H]WB4101. *J Recept Res* 1994; 14:75-98.
- Ho SL, Honner V, Docherty JR. Investigation of the subtypes of α_2 -adrenoceptor mediating prejunctional inhibition in rat atrium and cerebral cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357:634-639.
- Hoffman BB, Delean A, Wood CL, Schocken DD, Lefkowitz RJ. Alpha-adrenergic receptor subtypes: quantitative assessment by ligand binding. *Life Sci* 1979; 24:1739-1746.
- Hoffman BB, Lavin TN, Lefkowitz RJ, Ruffolo RRJr. α -adrenergic receptor subtypes in rabbit uterus: mediation of myometrial contraction and regulation by estrogens. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219:290-295.
- Holck MI; Jones CH, Haeusler G. Differential interactions of clonidine and methoxamine with postsynaptic alpha-adrenoceptor of rabbit main pulmonary artery. *J cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:240-248.
- Hosoi M, Nishizawa Y, Morii H. [PTH, PTHrP, and CGRP in hypertension research]. *Nippon-Rinsho.* 1997 Aug; 55(8): 1950-1957.
- Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; 355:353-355.
- Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium currents in rat mast cells. *J physiol* 1993; 465:359-386.
- Hu XQ, Dyer DC. Heterogeneity and complexity of alpha 1-adrenoceptors in the ovine uterine artery and umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 1997 Apr 11; 324(1): 67-75.
- Hu ZW, Miller JW, Hoffman BB. Induction of enhanced release of endothelium-derived relaxing factor after prolonged exposure to alpha-adrenergic agonist: role of desensitization of smooth muscle contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:337-343.
- Hulter HN, Melby JC, Peterson JC, Cooke CR. Chronic continuous PTH infusion results in hypertension in normal subjects. *J Clin Hypertens* 1986; 4:360-370.
- Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi R, Sutton J, Eglen RM. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* 1997; 122:1339-1344.

- Hussain M, Marshall I. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J pharmacol* 1997; 122:849-858.
- Hwa J, De Young MB, Perez DM, Graham RM. Autonomic control of myocardium: alpha-adrenoceptor mechanisms. In: Burnstock G, ed., Sheperd J, Vatner S.F., volume eds. *The Autonomic Nervous System, Volume VIII, The Nervous Control of the Heart*. Cambridge, Mass: Harvard University Press. In press.
- Hynes MD, Atlas D, Ruffolo RRJr. Analgesic activity of HP-aminoclonidine, a novel analog of clonidine: role of opioid receptors and α -adrenoceptors. *Pharmac Biochem Behav* 1983; 19:879-882.
- Ifudu O, Matthew JJ, Macey LJ, Hong JS, Sumrani N, Sommer BG, Friedman EA. Parathyroidectomy does not correct hypertension in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Nephrol* 1998; 18(1): 28-34.
- Iismaa T; Biden TJ; Shine J. *G-Protein-Coupled Receptors*. New York, NY: CRC Press; 1994.
- Innemee HC, De Jonge A, JCA, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. The effect of selective alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor stimulation on intraocular pressure in the conscious rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981; 316:294-298.
- Irvine RF. Inositol-phosphates and Ca^{2+} entry: towards a proliferation or a simplification? *FASEB J* 1992; 6:3085-3091.
- Ishac EJM, Lazar-Wesley E, Kunos G. Rapid inverse changes in α_{1B} - and β_2 -adrenergic receptors and gene transcripts in acutely isolated rat liver cells. *J Cell Physiol* 1992; 152:79-86.
- Itoh H, Kohli JD, Rajjer SY. Pharmacological characterization of the postsynaptic alpha-adrenoceptors in isolated canine mesenteric arteries and veins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 335:44-49.
- Julius-S. Amlodipine in hypertension: an overview of the clinical dossier. *J-Cardiovasc-Pharmacol*. 1988; 12 Suppl 7: S27-33.
- Kynast-Gales SA, Massey LK. Effects of dietary calcium from dairy products on ambulatory blood pressure in hypertensive men. *J Am Diet Assoc* 1992; 92:1497-1501.
- Jakobs-KH; Schultz-G. Signal transformation involving alpha-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4 Suppl 1:S63-S67.
- Jansson CC, Karp M; Oker-Blom C, Nasman J, Savola JM, Akerman KEO. Two human α_2 -adrenoceptor subtypes α_2A -C 10 and α_2B -C2 expressed in sf9 cells couple to transducer pathway resulting in opposite effects on cAMP production. *Eur J Pharmacol* 1995; 290:75-83.
- Jie K, Van Brummelen P, Verney P, et al. Identification of vascular postsynaptic α_1 - and α_2 -adrenoceptors in man. *Circ Res* 1984; 54(4):447-452.
- Jie K, Van Brummelen P, Verney P, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Alpha₁- and alpha₂-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the forearm of normotensive and hypertensive subjects. *J Cardiovasc pharmacol* 1986; 8:190-196.
- Jim KF, Matthews WD. Role of extracellular calcium in contractions produced by activation of postsynaptic alpha-2 adrenoceptors in the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 1985 Jul; 234(1): 161-165.
- Jirakulsomchok S, Mozaffari MS, Oparil S, Wyss JM. Dietary Ca^{2+} increases natriuretic and diuretic responses to volume loading in NaCl-sensitive spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990; 8:947-951.

- Jolma P, Kalliovalkama J, Tolvanen JP, Koobi P, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Wu X, Porsti I. High-calcium diet enhances vasorelaxation in nitric oxide-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Sep; 279(3): H1036-H1043.
- Kable JW, Murrin LC, Bylund DB. In vivo modification elucidates subtype-specific functions of α_2 -adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(1):1-7.
- Kageyama M, Yanagisawa T, Taira N. Calcitonin gene-related peptide relaxes porcine coronary arteries via cyclic AMP-dependent mechanisms, but not activation of ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265:490-497.
- Kalkman HO, Van Gelderen EM, Timmermans PB, Van Zwieten PA. Involvement of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in the vasoconstriction caused by ergometrine. *Eur J Pharmacol* 1982 Feb 19; 78(1):107-111.
- Kaneko K, Sunano S. Involvement of α -adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1993; 240:195-200.
- Kaplan-NM. Amlodipine in the treatment of hypertension. *Postgrad-Med-J.* 1991; 67 Suppl 5: S15-9.
- Karanja-N; Metz-JA; Mercer-LP; McCarron-DA. Analysis of BP response and Ca²⁺ metabolism using the saturation kinetics model. *Am-J-Physiol.* 1987 Sep; 253(3 Pt 2): R501-8.
- Karasawa-F; Adachi-Y; Hashimoto-K; Ohishi-S; Kizaki-T; Ookawara-T; Ohno-H; Sato-T Effects of dietary calcium restriction on vascular constriction and relaxation of the rat isolated aorta. *Res-Commun-Mol-Pathol-Pharmacol.* 1998 Aug; 101(2): 187-99.
- Karlner JS, Barnes P, Hamilton CA, Dollery CT. α_1 -Adrenergic receptors in guinea pig myocardium: identification by binding of a new radioligand. [³H]-prazosin. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90:142-149.
- Karns LR, kariya K-i, Simpson PC, M-CAT, CarG, and Sp1 elements are required for α_1 -adrenergic induction of the skeletal α -actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1995; 270:410-417.
- Kass-RS; Arena-JP; Chin-S. Cellular electrophysiology of amlodipine: probing the cardiac L-type calcium channel. *Am-J-Cardiol.* 1989 Nov 7; 64(17): 351-411; discussion 411-421.
- Kass-RS; Arena-JP; Chin-S. Block of L-type calcium channels by charged dihydropyridines. Sensitivity to side of application and calcium. *J-Gen-Physiol.* 1991 Jul; 98(1): 63-75.
- Katayama S, Maruno Y, Itabashi A, Inaba M, Akabane S, Tanaka K, Shibuya M, Kawazu S, Ishii J, ET AL. Effect of dietary calcium on renal prostaglandins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1991; 42:197-200.
- Kato H, Takenawa T. Phospholipase C activation and diacylglycerol kinase inactivation lead to an increase in diacylglycerol content in spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 Aug 14; 146(3): 1419-1424.
- Kaumann AJ. Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(3):70-76.
- Kaumann AJ; Lemoine H. Direct labelling of myocardial beta11-adrenoceptors. Comparison of binding affinity of 3H(-)-bisoprolol with its blocking potency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985; 331(1):27-39.
- Kava MS, Blue DR, Vimont RL, Clarke DE, Ford APDW. α_{1L} -Adrenoceptor mediation of smooth muscle contraction in rabbit bladder neck: a model for lower urinary tract tissues of man. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1359-1366.

- Keast JR, Kawatani M, de Groat WC. Sympathetic modulation of cholinergic transmission in cat vesical ganglia is mediated by α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Am J Physiol* 1990; 258:R44-R50.
- King HK, Goetz AS, Ward SDC, Saussy DL. AH11110A is selective for the α_1B subtype of α_1 adrenoceptors. *Soc Neurosci Abstr* 1994; 20:526.
- Kiowski W, Hutlen UL, Ritz R, Buhler-FR. Alpha 2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction of arteries. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34:565-569.
- Kirby R, Jardin A. Doxazosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. A review of the safety profile in older patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 1997; 1:84-89.
- Kishimoto A, Takai A, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 1980; 255:2273-2276.
- Kishimoto H, Tsumura K, Fujioka S, Uchimoto S, Morii H. Chronic parathyroid hormone administration reverses the antihypertensive effect of calcium loading in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1993 Mar; 6(3 Pt 1): 234-240.
- Knepper Sm, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD, Hancock AA. A-61603, a potent α_1 -adrenergic receptor agonist, selective for the α_{1A} receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274:97-103.
- Kobilka BK, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding for the human platelet α_2 adrenergic receptor. *Science* 1987; 238: 650-656.
- Kobilka BK. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha sub 2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 1996; 273: 803-806.
- Kobinger W. Central α -adrenergic system as targets for antihypertensive drugs. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1978; 81:39-100.
- Kobinger W. Central antihypertensives. In: Parnham MJ, Bruinvels J (eds) *Discoveries in Pharmacology*, vol 2; 1984. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 107-123.
- Kobinger, W., Pichler, L. Investigation into different types of post- and presynaptic alpha-adrenoceptors at cardiovascular sites in rats. *Eur J Pharmacol* 1980; 65(4):393-402.
- Kobinger, W., Pichler, L. alpha 2-Adrenoceptor agonistic effect of B-HT 920 in isolated perfused hindquarters of rats. *Eur J Pharmacol* 1981; 76:101-105.
- Kobinger, W., Pichler, L. Presynaptic activity of the imidazoline derivative ST 587, a highly selective alpha-1 adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1982; 82:203-206.
- Kobrin I, Pegram BL, Frohlich ED. Acute pressure increase and intrarenal hemodynamics in conscious WKY and SHR rats. *Am J Physiol* 1985 Dec; 249(6 Pt 2): H1114-H11148.
- Kondo K, Suzuki H, Handa M, Nagahama S, Saruta T. Effects of intracerebroventricular administration of dopamine and metoclopramide on blood pressure in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981; 250:273-278.
- Kondo J, Yamada Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. 1,2-diacylglycerol content in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *Basic Res Cardiol* 1990 Sep-Oct; 85(5): 453-460.
- Kost T, Kadwell S, Watson M, Clay W, Goetz A, King H, Wisely B, Lewis K, Patel I, Su JL, Graham RM, Tseng-Crank J, Saussy D, Buckholz R. Control of α_1 -adrenergic receptor expression by NH₂-terminal extracellular domain sequences: pharmacology of adrenoceptors. In: *Satellite Symposium of the XIIth UIPHAR Congress; King of Prussia, Pa; July 21-23, 1994.*

- Kou, K., Ibengwe, J., Suzuki, A. Effects of alpha-adrenoceptor antagonists on electrical and mechanical responses of the isolated dog mesenteric vein to perivascular nerve stimulation and exogenous noradrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 326:7-13.
- Kromhout D, Bosschieter DB, Coulander C. Potassium, calcium, alcohol intake and blood pressure. The Zutphen study. *Am J Clin Nutr* 1985; 41:1299-1304.
- Kubo T, Goshima Y, Ueda H, Misu Y. Diminished alpha 2-adrenoceptor-mediated modulation of noradrenergic neurotransmission in the posterior hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 1986; 65(1):29-34.
- Kunos G, Matrianni JA, Dalkovits M, Mosqueda-García R. Brainstem-dopaminergic mechanism in the regulation of blood pressure and heart rate. *Eur J Pharmacol* 1990; 183:7-8.
- Kwan DC. Heterogeneity of vascular smooth muscle alpha-adrenoceptors in canine blood vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26(10):822-823.
- Heynen-G. Amlodipine: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of a calcium antagonist with prolonged effect]. *Schweiz-Rundsch-Med-Prax.* 1992 Feb 11; 81(7): 199-203.
- Lacerda-AE; Kim-HS; Ruth-P; Perez-Reyes-E; Flockerzi-V; Hofmann-F ;Birbaumer-L; Brown-AM Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature.* 1991 Aug 8; 352(6335): 527-30.
- Lachnitt WG, Tran AM, Clarke DE, Ford APDW, Pharmacological characterization of an α_{1A} -adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery. *Br J Pharmacol* 1997;120:819-826.
- Lafferty FW. Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests. *Arch Intern Med* 1981 Dec; 141(13): 1761-1766.
- Lafontan M, Berlan M. Evidence for the alpha 2 nature of the alpha-adrenergic receptor inhibiting lipolysis in human fat cells. *Eur J Pharmacol* 1980 Aug 22; 66(1):87-93.
- Lafontan, M., Berlan, M. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2:126-129.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff, JP, Luduena, FP, Brown, TGJr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967a; 214:597-598.
- Lands AM, Groblewski GE, Brown TGJr. Comparison of the action of isoproterenol and several related compounds on blood pressure, heart and bronchioles- *Arch Intern Pharmacodyn Ther* 1966; 161(1):68-75.
- Lands, A.M., Luduena, F.P., Buzzo, H.J. Differentiation of receptor responsive to isoproterenol. *Life Sci* 1967b; 6:2241-2249
- Langer, S.Z. In "Frontiers in catecholamine Research" (E. Usdin, s.h. Snyder eds), pp. 543-549. Pergamon Press new York. 1973.
- Langer, S.Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 1974; 23:1793-1800.
- Langer, S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 1981; 32:337-362.
- Langer, S.Z., Adler, E., Enero, M.A., Stefano, F.J.E The role of the α -adrenoceptor subtypes. *Proc Int Union Physiol Sci* 1971; 9:335.
- Langer, S.Z., Massingham, R., Shepperson, N. Presence of postsynaptic α_2 -adrenoceptors of predominantly extrasynaptic location in the vascular smooth muscle of the dog hind limb. *Clin Sci* 1980; 59:225s-228s.

- Langer, S.Z.; Shepperson, N.B. Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors and the role of neuronal uptake. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:S8-S13.
- Lanier SM. Regulation of alpha₂-adrenergic receptor signalling. *Pharmacol Commun* 1995; 6:133-137.
- Lanier SM, Downing S, Duzie E, Homcy CJ. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha₂-adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J Biol Chem* 1991; 266:10470-10478.
- Lau K, Thomas D, Eby B. The nature and role of disturbances in calcium metabolism in genetic hypertension. *Fed Proc* 1986b; 45:2752-2757.
- Laz TM, Forray C, Smith K, Bard JA; Vaysse PJ-J, Branchek TA, Weinshank RL. The rat homologue of the bovine alpha_{1C}-adrenergic receptor shows the pharmacological properties of the classical alpha_{1A} subtype. *Mol Pharmacol* 1994; 46:414-422.
- Lazou A, Bogoyevitch MA, Clerk A, Fuller SJ, Marshall CJ, Sudgen PH. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade in adult rat heart preparations in vitro. *Circ Res* 1994; 75:932-941.
- Law, M.P., Osman, S., Pike, V.W., Davenport, R.J., Cunningham, V.J., Rimoldi, O., Rhodes CG, Giardina D, Camici PG. Evaluation of [11C] GB67, a novel radioligand for imaging myocardial alpha 1-adrenoceptors with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 2000; 27(1):7-17.
- Lee HR, Hendreson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR. alpha₁-Adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1988; 263:7352-7358.
- Leeb-Lundberg LMF, Dickinson KEJ, Heald SL; Wickberg JES, Hagen PD, DEBernardis JF, Winn M, Arendsen DL, Lefkowitz RJ, Caron MG. Photoaffinity labeling of mammalian alpha₁-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1984; 259:2579-2587.
- Leech CJ, Faber JE. Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. *Am J Physiol* 1996; 270(2 Pt 2):H710-H722.
- Lefevre-Borg F., O'Connor SE, Shoemaker H, Hicks PE, Lechaire J, Gautier E, Pierre F, Pimoule C, Manoury P. Langer SZ. Alfuzosin, a selective alpha₁-adrenoceptor antagonists in the lower urinary tract. *Br J Pharmacol* 1993; 109:1282-1289.
- Lefkowitz RJ; Caron MG. Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 1988; 263:4993-4996.
- Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR. International union of pharmacology, x: recommendation for nomenclature of alpha₁-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 1995; 47:267-270.;
- Lehmann J; Koenig-Berard E; Vitou P. The imidazoline-preferring receptor. *Life Sci* 1989; 45:1609-1615.
- Leitjen P, Cauvin C, Lodge N, Saida K, Van Breemen C. Ca²⁺ sources mobilized by alpha₁ receptor activation in vascular smooth muscle. *Clin Sci* 1985; 68(Suppl. 10):47s-50s.
- Lemoine H, Ehle B, Kauman AJ: Direct labelling of beta2-adrenoceptors. Comparison of binding potency 3H-ICI 118, 551 and blocking potency of ICI 118,551. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985; 331(1):40-51.
- Lepor H, Shapiro E. Characterization of alpha₁-adrenergic receptors in human benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1984; 132:1226-1229.
- Lepor H, Tang R, Shapiro E. The alpha-adrenoceptor subtype mediating the tension of human prostatic smooth muscle. *Prostate* 1993; 22:301-307.

- Lewanczuk RZ, Wang J, Zhang ZR, Pang PK. Effects of spontaneously hypertensive rat plasma on blood pressure and tail artery calcium uptake in normotensive rats. *Am J Hypertens* 1989; 2:26-31.
- Lewanczuk RZ, Pang PK. Parathyroid hypertensive factor is present in DOCA-salt but not two-kidney-one-clip hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1991; 4(10 Pt 1):802-805.
- Levey WA, Manore MM, Vaughan LA, Carroll SS, VanHalderen L, Felicetta J. Blood pressure responses of white men with hypertension to two low-sodium metabolic diets with different levels of dietary calcium. *J Am Diet Assoc* 1995 Nov; 95(11): 1280-1287.
- Levin TB, Francis GS, Goldsmith SR, Simon AB, Cohn JN. Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1981; 49:1659-1666.
- Levi M, Henrich WL. Dietary calcium modulates renal BBM angiotensin II binding and Na⁺-H⁺ antiporter activity in SHR. *Am J Physiol* 1991; 260:F657-F662.
- Li Y, Duckles SP. Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol* 1992; 210:23-30.
- Limas CJ, Limas C. Altered intracellular adrenoceptor distribution in myocardium of spontaneously
- Limberger N, Tredelenburg AU, Starke K. Pharmacological characterisation of presynaptic α_2 -autoreceptors in rat submaxillary gland and heart atrium. *Br J Pharmacol* 1992; 107:246-255.
- Limbird LE. GTP and Na⁺ modulate receptor-adenyl cyclase coupling and receptor-mediated function. *Am J Physiol* 1984 Jul; 247(1 Pt 1):E59-E68.
- Limbird LE, Speck JL. N-ethylmaleimide, elevated temperature, and digitonin solubilization eliminate guanine nucleotide but not sodium effects on human platelet alpha 2-adrenergic receptor-agonist interactions. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983; 9(3):191-201.
- Lin CM, Saito K, Tsujino T, Yokoyama M. Calcium supplementation inhibits the expression of parathyroid hypertensive factor in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1994; 7:201-204.
- Lind L, Lithell H, Gustafsson IB, Pollare T, Ljunghall S. Calcium metabolism and sodium sensitivity in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 1993 Feb; 7(1):53-57.
- Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Berstein D, Barsh GS, Kobilka BK: Cardiovascular regulation in mice lacking α_2 -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science (Wash DC)* 1996; 273:803-805.
- Liu-DT; Birchall-I; Hewitson-T; Kincaid-Smith-P; Whitworth-JA. Effect of dietary calcium on the development of hypertension and hypertensive vascular lesions in DOCA-salt and two-kidney, one clip hypertensive rats. *J-Hypertens*. 1994 Feb; 12(2): 145-53.
- Llahi S, Fain JN. α_1 -Adrenergic receptor-mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 1992; 267:3679-3685.
- Lokhandwala MF, Coats JT, Buckley JP. Effects of several catecholamines on sympathetic transmission to the myocardium: role of presynaptic alpha-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1977; 42(3):257-265.
- Lomasney JW, Leeb-Lundberg LMF, Cotecchia F, Regan JW, DeBernardis JF, Caron MG, Lefkowitz RJ. Mammalian α_1 -adrenergic receptor: purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J Biol Chem* 1986; 621:7710-7716.
- Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Expansion of the α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:5094-5098.

- Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA; Yang-Feng TL, Brownstein M., Lefkowitz RJ, Caron MG. Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem* 1991; 266:6365-6369.
- Lopez-Jaramillo-P. Calcium, nitric oxide, and preeclampsia. *Semin-Perinatol.* 2000 Feb; 24(1): 33-6.
- López-Jaramillo P, González MC, Palmer RM, Moncada S. The crucial role of physiological Ca^{2+} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990; 101:489-493.
- López-Jaramillo P, Narvaez M, Weigell RM, Yopez R. Calcium supplementation reduces the risk of pregnancy-induced hypertension in an Andes population. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96:648-655.
- López-Jaramillo P, de Felix M. Prevention of toxemia of pregnancy in Ecuadorian Andean women: experience with dietary calcium supplementation. *Bull Pan Am Health Organ* 1991a; 25:109-117.
- López-Jaramillo P, De Felix M. Uso de calcio en la prevención de la hipertensión inducida por el embarazo. *Bol Oficina Sanit Panam* 1991b; 110:126-135.
- López-Miranda V, Aleixandre MA, Ortega A, Puerro M. Calcium-deficient diet enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats. Effect of Amlodipine. XIX Reun Nac Soc Esp Farmacol (Madrid) Octubre 1995; P-58, 119.
- López-Miranda V, Ortega A, Puerro M, Aleixandre MA. Alpha-pressor responses in pithed rats fed on a low-calcium diet. *Br J Pharmacol* 1996; 119 Proceedings Supplement 88P.
- López-Miranda V, Ortega A, Puerro M, Aleixandre MA. Arterial blood pressure and growth patterns in Sprague-Dawley and spontaneously hypertensive rats fed on calcium-deficient diets. *Pharmacol Rev Commun* 1996; 8:291-297.
- López-Miranda V, Civantos B, Blasco R, Fernández R, Aleixandre MA. Parathyroid hormone and calcitriol in the hypertension caused by dietary calcium deficiency in rats. *J Vasc Res* 1998; 35:397-404.
- López-Miranda V, Ortega A, Civantos B, Aleixandre A. Arterial blood pressure and nitric oxide in rats fed on calcium-deficient diets. *Br J Pharmacol* 1997; 120 Proceedings Supplement:161P.
- Lorenz W, Lomasney JW, Collins S, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Expression of three α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implications for α_2 receptor classification. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 599-603.
- Loutzenhiser R, Van Breemen C. The influence of receptor occupation on Ca^{2+} influx-mediated vascular smooth muscle contraction. *Circ Res* 1983; 52(suppl I):97-103.
- Luckensmeyer GB, Keast JR. Activation of alpha- and beta-adrenoceptors by sympathetic nerve stimulation in the large intestine of the rat. *J Physiol Lond* 1998 Jul 15; 510 (Pt 2): 549-561.
- Lues I; Schümann HJ. B-HT 920 acts as an alpha-1 adrenoceptor agonist in the rabbit aorta under certain in vitro conditions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 325:42-46.
- Luft FC. Putative mechanism of blood pressure reduction induced by increases in dietary calcium intake. *Am J Hypertens* 1990; 3:156S-160S.
- Lund-Johansen-P; Omvik-P; White-W; Digraanes-O; Helland-B; Jordal-O; Stray-T Long-term haemodynamic effects of amlodipine at rest and during exercise in essential hypertension. *J-Hypertens.* 1990 Dec; 8(12): 1129-36.
- MacLennan SJ, Luong LA, Jasper JR, To ZP, Eglen RM. Characterization of α_2 -adrenoceptors mediating contraction of dog saphenous vein: identity with human 2A subtype. *Br J Pharmacol* 1997; 121:1721-1729.

- MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE, 1996. Central hypotensive effects of the alpha sub 2a-adrenergic subtype. *Science* 273:801-803 .
- Macrez Leprête N, Morel, J.L., Mironneau, J. Effects of phospholipase C inhibitors on Ca²⁺ channel stimulation and CA²⁺ release from intracellular stores evoked by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in rat portal vein myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218:1 30-4.
- Mäkynen H, Arvola P, Vapaatalo H, Porsti I. High calcium diet effectively opposes the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in rats. *Am J Hypertens* 1994, 7(6):520-528.
- Mäkynen H, Kahonen M, Arvola P, Wuorela H, Vapaatalo H, Porsti I. Dietary calcium and magnesium supplements in spontaneously hypertensive rats and isolated arterial reactivity. *Br J Pharmacol* 1995; 115:1455-1462.
- Mäkynen H, Kahonen M, Wu X, Arvola P, Porsti I. Endothelial function in deoxycorticosterone-NaCl hypertension: effect of calcium supplementation. *Circulation* 1996; 93:1000-1008.
- Majesky MW, Daemen MJA, Schwartz SM. α_1 -Adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *J Biol Chem* 1990; 265:1082-1088.
- Manara-L; Croci-T; Landi-M. Beta 3-adrenoceptors and intestinal motility. *Fundam-Clin-Pharmacol*. 1995; 9(4): 332-42.
- Mangiarua EI, Wright GL, McCumbee WD. Effect of dietary calcium on in vitro aortic tissue responsiveness to a hypertensive factor. *Clin Exp Hypertens* 1990; 12:1255-1279.
- Mann JF, Bommer J, Kreusser W, Klooker P, Rambašek M, Ritz E. Parathormone and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Adv Exp Med Biol* 1984; 178: 291-293.
- Marjamäki A, Pihlavisto M, Cockcroft V, Heinonen P, Savola JM, Scheinin M. Chloroethylclonidine binds irreversibly to exposed cysteines in the fifth membrane-spanning domain of the human alpha2A-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1998; 53(3):370-376.
- Mark WM, Mat JAPD, Stephens MS. α_1 -Adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1990; 270:296-299.
- Marshall I, Burt RP, Chapple CR. Noradrenaline contractions of human prostate mediated by α_{1A} -(α_{1C} -) adrenoceptor subtype. *Br J Pharmacol* 1995; 115:781-786.
- Masutani M, Ohyanagi M, Shibuya J, Ishigami Y, Iwasaki T. A decrease in the amount and function of inhibitory GTP-binding protein in the resistance small artery from spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79(2):185-193.
- Matthews WD, Jim KF, Hieble JP, DeMarinis RM. Postsynaptic alpha adrenoceptors on vascular smooth muscle. *Fed Proc* 1984 Nov; 43(14): 2923-2928.
- Mattiason I, Mattiason B, Hood B. The efflux rate of norepinephrine from platelets and its relation to blood pressure. *Life Sci* 1979; 24:2265-2272.
- McCafferty GP, Naselsky DP, Hieble JP. Characterization of postjunctional alpha-adrenoceptors in the pithed mouse. *Gen Pharmacol* 1999; 33(1):99-105.
- McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat: Attenuation of hypertension by calcium supplementation. *Hypertension* 1981; 4:1162-1167.
- McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, Stanton JL. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 1984; 224:1392-1398.
- McCarron DA, Lucas PA, Scneidman RJ, Lacour B, Drüeke T. Blood pressure development of the spontaneously hypertensive rat after concurrent manipulations of dietary Ca²⁺ and Na⁺. *J Clin Invest* 1985; 76:1147-1154.

- McCarron DA, Morris CD. Blood pressure response to oral calcium in persons with mild to moderate hypertension. *Ann Int Med* 1985; 103:825-831.
- McCarty MF. Parathyroid hormone may be a cancer promoter - an explanation for the decrease in cancer risk associated with ultraviolet light, calcium, and vitamin. *Med Hypotheses* 2000 Mar; 54(3): 475-482.
- Mc Cubbin JW, Kaneko Y, Page IH. Ability of serotonin and norepinephrine to mimic the central effects of reserpine on vasomotor activity. *Circ Res* 1960; 8:849-858.
- McGrath JC, O'Brien JW: Blockade by nifedipine of responses to intravenous bolus injection or infusion of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors agonists in the pithed rat. *Br J pharmacol* 1987; 91:355-365.
- McGrath JC, Brown CM, Wilson VG. Alpha-adrenoceptors: a critical review. *Med Res Rev* 1989; 9:407-533.
- McGrath, J.C. Evidence for more than one type of post-junctional α -adrenoceptor. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:467-484.
- McGrath JC, Naghadeh MA, Padiani JD, Mackenzie JF, Daly CJ,. Importance of agonists in alpha-adrenoceptors in human prostate, *Eur Urol* 1999; 36(1): 80-88.
- Meana J, Garcia-Sevilla JA. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A. *Farmacología Humana*. De. Masson 1997:15:235-260.
- Medgett IC. Alpha-2 adrenoceptors mediate sympathetic vasoconstriction in distal segments of rat artery. *Eur J Pharmacol* 1985; 108:281-287.
- Medgett IC, Langer SZ. Heterogeneity of smooth muscle α -adrenoceptors in rat tail artery *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229:823-830.
- Medgett IC, Rajanayagam MA. Effects of reduced calcium ion concentration and of diltiazem on vasoconstrictor responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation in rat isolated tail artery. *Br J Pharmacol* 1984 Dec; 83(4): 889-898.
- Meisheri KD, Hwang O, Van Breemen C. Evidence for two separate Ca^{2+} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membrane Biol* 1981; 59:19-25.
- Metz JA, karanja J, Toro KJ, McCarron DA. Modification of total body fat in spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats by dietary calcium and sodium. *Am J Hypertens* 1988; 1:58-60.
- Miach PJ, Dausse JP, Cardot A, Meyer P. 3H-Prazosin binds specifically to 'alpha 1'-adrenoceptors in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980; 317:273-275.
- Michell RH. Inositol phospholipids in membrane function. *Trends Biochem Sci* 1979; 4:128-131.
- Michel MC, Hanft G, Gross G. α_{1B} - but not α_{1A} -adrenoceptors mediate inositol phosphate generation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 341:385-387.
- Michel AD, Loury DN, Whiting RL. Differences between the α_2 -adrenoceptor in rat submaxillary gland and the α_{2A} - and α_{2B} -adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1989; 98:890-897.
- Michel MC, Siepmann F, Buscher R, Philipp T, Brodde OE. Ontogenesis of sympathetic responsiveness in spontaneously hypertensive rats. I. Renal alpha 1-, alpha 2-, and beta-adrenergic receptors and their signaling. *Hypertension* 1993 Aug; 22(2): 169-177.
- Michel MC, Rump LC. alpha-Adrenergic regulation of human renal function. *Fundam and Clinical Pharmacology* 1996; 10(6):493-503.

- Miller RJ. Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:201-227.
- Miller M. Clonidine-induced diuresis in the rat: evidence for a renal site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1980 Sep; 214(3): 608-613.
- Mills DCB. Initial biochemical responses of platelets to stimulation. *CIBA Found Symp* 1975; 35:153-167.
- Minneman K.P. Alpha1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol rev* 1988; 40:87-119.
- Minneman KP, Esbensahde TA. α_1 -Adrenergic receptor subtypes. *Annu rev Pharmacol Toxicol* 1994; 34:117-133.
- Minneman KP; Theroux TL; Hollinger S; Han C; Esbenshade TA. Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1994 Nov; 46(5): 929-936.
- Miriell VA, Mauban JR, Blaustein MP, Wier WG. Local and cellular Ca transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol Lond* 1999; 518(Pt 3):815-824.
- Mita M, Walsh P. α_1 -Adrenoceptor-mediated phosphorylation of myosin in rat-tail arterial smooth muscle. *Biochem J* 1997; 327:669-674.
- Miyata N, Tsuchida K, Otomo S. Enhanced contractile effect of phorbol dibutyrate in portal veins from hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 May 15; 176(3): 1552-1556.
- Mo FM, Kwan CY. Alpha-adrenoceptor subtypes of dog saphenous vein: another unusual property. *Life Sciences* 1998; 62(17-18): 1455-1459.
- Molderings GJ, Gothert M. Subtype determination of preynaptic α_2 -adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery and human saphenous vein. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995; 352:483-490.
- Montero M, Alvarez J, García-Sancho J.. Agonist-induced calcium influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem J* 1992; 227:73-79.
- Moriyama N, Nasu K, Takeuchi T, Akiyama K, Murata S, Mishimatsu H, Yano J, Tsujimoto G, Kawabe K. Quantification and distribution of α_1 -adrenoceptor subtype mRNAs in human vas deferens: comparison with those of epididymal and pelvic portions. *Br J Pharmacol* 1997; 122:1009-1014.
- Morris MJ, Devynk MA; WOODCOK EA, et al: Specific changes in hypothalamic α -adrenoceptors in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1981, 3:516-520.
- Morrow AL, Creese I. Characterization of α_1 -adrenergic subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB 4101 and [3H]prazosin binding. *Mol Pharmacol* 29:321-330.
- Motley ED, Ruffolo RR Jr, Nichols AJ. The effect of pertussis toxin treatment on alpha-1-adrenoceptor-mediated pressor responses in the pithed rat: dependence on agonist efficacy but not chemical class. *Pharmacology* 1992; 45(6): 338-344.
- Moulds RF, Stevens MJ. Allpha-adrenergic mechanisms in human peripheral blood vessels. In the *Peripheral Circulation*, ed by S. Hunyor, J. Ludbrook, J. Schawand and M. McGrath 1984; pp99-106, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Muntz KH, Garcia C, Hagler HK. Alpha 1-Receptor localization in rat heart and kidney using autoradiography. *Am J Physiol* 1985 Sep; 249(3 Pt 2): H512-H519.
- Muntz KH, Meyer L, Gadol S, Calianos TA. Alpha-2 adrenergic receptor localization in the rat heart and kidney using autoradiography and tritiated rauwolscine. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 Feb; 236(2): 542-547.

- Muntzel-MS; Hatton-DC; Metz-JA; McCarron-DA. Dietary calcium alters blood pressure in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1989 Mar; 2(3 Pt 1): 158-62
- Muraki T, Nakaki T, Kato R. Predominance of alpha 2-adrenoceptors in porcine thyroid: biochemical and pharmacological correlations. *Endocrinology* 1984 May; 114(5):1645-1651.
- Muramatsu I, Ohmura T, Kigoshi S, Hashimoto S, Oshita M. Pharmacological subclassification of α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1990; 99:197-201.
- Muramatsu I, Oshita M, Ohmura T, Kigoshi S, Akino H, Gobora M, Okada K. Pharmacological characterization of α_1 subtypes in the human prostate : Functional and binding studies. *Br J Urol* 1994; 74:572-578.
- Muramatsu I, Ohmura T, Hashimoto S, Oshita M. Functional subclassification of vascular α_1 -adrenoceptors. *Pharmacol Commun* 1995; 6:23-28.
- Murayama-T; Ui-M. Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* 1983 Mar 10; 258(5):3319-3326.
- Murphy TJ; Bylund DB. Characterization of alpha-2 adrenergic receptors in the OK cell, an opossum kidney cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244:571-578.
- Murphy VA, Smith QR, Rapoport SI. Homeostasis of brain and cerebrospinal fluid calcium concentrations during chronic hypo- and hypercalcemia. *J Neurochem* 1986; 47:1735-1741.
- Musgrave I, Marely P, Majewski H. Pertussis toxin does not attenuate α_2 -adrenoceptor mediated inhibition of noradrenaline release in mouse atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 336:280-286.
- Nagashima M, Hattori Y, Akaishi Y, Tohse N, Sakuma Y, Kitabatake A, Kanno M. α_1 -Adrenoceptor subtypes mediating ionotropic and electrophysiological effects in mammalian myocardium. *Am J Physiol* 1996; 271(Heart Circ Physiol 40): H1423-H1432.
- Nair R, Dyer DC. Pharmacological characterization of alpha 1-adrenoceptors in porcine uterine artery. *Eur J Pharmacol* 1996; 312(1):45-51.
- Nakadate T, Nakaki T, Muraki T, Kato R. Regulation of plasma insulin level by alpha 2-adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol* 1980; 65:421-424.
- Nakayama H, Taki M, Striessnig J, Glossmann H, Catterall WA, Kanaoka Y. Identification of 1,4-dihydropyridine binding regions within the alpha 1 subunit of skeletal muscle Ca²⁺ channels by photoaffinity labeling with diazepam. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 Oct 15; 88(20):9203-9207.
- Nasman J, Jansson CC, Akerman KEO. The second intracellular loop of the α_2 -adrenergic receptors determines subtype-specific coupling to cAMP production. *J Biol Chem* 1997; 272:9703-9708.
- Navarro Lopez F, Llorian A, Ferrer Roca O, Betriu A, Sanz G. Restrictive cardiomyopathy in pseudoxanthoma elasticum. *Chest* 1980 Jul; 78(1):113-115.
- Naylor WG. *Amlodipino*. ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1994.
- Nebigil C, Malik KU. Comparison of signal transduction mechanisms of alpha-2C and alpha-1A adrenergic receptor-stimulated prostaglandin synthesis. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:987-996.
- Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature* 1990; 344:770-773.

- Neuser D, Schulte Brinkmann R, Kazda S. Influence of transplantation of parathyroid glands on blood pressure development in stroke prone spontaneously hypertensive rats and in normotensive Wistar Kyoto rats. *Clin Exp Hypertens A* 1991; 13(3): 325-338.
- Nguyen AT, Hayward-Lester A, Sabatini S, Doris PA. Renal Na⁺, K⁺-ATPase in SHR: studies of activity and gene expression. *Clin Exp Hypertens* 1998 Jul-Aug; 20(5-6): 641-656.
- Nichols-AJ; Motley-ED; Ruffolo-RR Jr. Differential effect of pertussis toxin on pre- and postjunctional alpha 2-adrenoceptors in the cardiovascular system of the pithed rat. *Eur J Pharmacol* 1988 Jan 19; 145(3):345-349.
- Nichols-AJ; Motley-ED; Ruffolo-RR Jr. Effect of pertussis toxin treatment on postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor function in the cardiovascular system of the pithed rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 Apr; 249(1):203-209.
- Nishikawa M, Sellers J, Adelstein R, Hidaka H. Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of smooth muscle heavy meromyosin and myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 1984; 259:8808-8814.
- Nishimura Y, Suzuki A. Relaxant effects of vasodilator peptides on isolated basilar arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24(2):157-161.
- Noble AJ, Chess-Williams R, Couldwell C, Furukawa K, Uchiyama T, Korstanje C, Chapple CR. The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional α_{1A} and α_{1D} -adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1997; 120:231-238.
- Nuttall A, Snow HM. The cardiovascular effects of ICI 118,587: A beta 1-adrenoceptor partial agonist. *Br J Pharmacol* 1982 Oct; 77(2): 381-388.
- Obiefuna PC, Ebeigbe AB, Sofola OA, Aloamaka CP. Altered responses of aortic smooth muscle from Sprague-Dawley rats with salt-induced hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18:813-818
- O'Dowd BF, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β_2 -adrenergic receptor: localization of regions involved in G-protein-receptor coupling. *J Biol Chem* 1988; 263:15985-15992.
- Ohmura T, Oshita M, Kigoshi S, Muramatsu I. Identification of α_1 -adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens: binding and functional studies. *Br J Pharmacol* 1992; 107:698-704.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27:282-293.
- Okimura-Y; Chihara-K; Abe-H; Kita-T; Kashio-Y; Sato-M; Fujita-T Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral organs of rats. *Regul Pept* 1987 Jun; 17(6): 327-337.
- Okumura K, Kondo J, Shirai Y, Muramatsu M, Yamada Y, Hashimoto H, Ito T. 1,2-diacylglycerol content in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990 Jul; 16(1): 43-48.
- Oparil S, Meng QC, Cheng YF, Jin H, Wyss JM. Genetic basis of Na Cl-sensitive hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12:S56-S69.
- Oparil S, Chen YF, Jin HK, Yang RH, Wyss JM. Dietary Ca²⁺ prevents NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats via sympatholytic and renal effects. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:227S-236S.
- Oparil S, Wyss JM, Yang RH, Jin HK, Chen YF. Dietary Ca²⁺ prevents NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats by a sympatholytic mechanism. *Am J Hypertens* 1990; 3:179S-188S.
- Oriowo MA, Bevan JA, Bevan RD. Variation in sensitivity of alpha adrenoceptor-mediated contraction of the vascular smooth muscle of the rabbit elastic and muscular arteries is related to receptor affinity. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 241:239?

- Orlov SN, Li JM, Tremblay J, Hamet P. Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension. *Semin Nephrol* 1995; 15:569-592.
- Orwoll ES, Oviatt S. Relationship of mineral metabolism and long-term calcium and cholecalciferol supplementation to blood pressure in normotensive men. *Am J Clin Nutr* 1990; 52:717-721.
- Oshita M, Hiraoka Y, Watanabe Y. Characterization of beta-adrenoceptors in urinary bladder: comparison between rat and rabbit. *Br J Pharmacol* 1997 Dec; 122(8):1720-1724.
- Oshima T, Young EW. Systemic and cellular calcium metabolism and hypertension. *Semin Nephrol* 1995 Nov; 15(6): 496-503.
- Oswald H, Greven J. Effects of adrenergic activators and inhibitors on kidney function. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1981 vol.54, pp.241-288 54:241-288, SZEKERES, L. (ed.) Springer, Berlin
- Oktay S, Onur R, Ilhan M, Kayaalp SO. Surgical stress inhibits physostigmine-induced pressor effect. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986 Oct; 283(2):237-242.
- Osterloh I. An update on the safety of amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S65-S68.
- Paalzow G, Paalzow L. Clonidine antinociceptive activity: effects of drugs influencing central monoaminergic and cholinergic mechanisms in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976; 292:119-126.
- Pang PK, Lewanczuk RZ, Benishin CG. Parathyroid hypertensive factor. *J Hypertens* 1990a; 8(7):S155-S159.
- Pang PK, Kaneko T, Lewanczuk RZ. Parathyroid origin of a new hypertensive factor. *Exp Gerontol* 1990b; 25(3-4):269-277.
- Pang PK, Benishin CG, Lewanczuk RZ. Parathyroid hypertensive factor, a circulating factor in animal and human hypertension. *Am J Hypertens* 1991a; 4:472-477.
- Pang PK, Lewanczuk RZ, Benishin CG. Parathyroid glands and cardiovascular functions. *Contrib Nephrol* 1991b; 90:65-71.
- Pang PK, Benishin CG, Lewanczuk RZ. Combined effect of dietary calcium and calcium antagonists on blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19:442-446.
- Pang PK, Shan JJ, Lewanczuk RZ, Benishin CG. Parathyroid hypertensive factor and intracellular calcium regulation. *J Hypertens* 1996 Sep; 14(9): 1053-60.
- Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. 3rd. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation* 1995;91:1732-1738.
- Papagalani N, Kourti A, Tolis A, Skopelitis P, Karabatsos A, Kostoyanni G, Gennadiou M, Elisaf M, Mountokalakis T. Effect of intravenous calcium infusion on indices of activity of the parathyroid glands and on urinary calcium and sodium excretion in normotensive and hypertensive subjects. *Am J Hypertens* 1993 Jan; 6(1):59-65.
- Parkinson NA, Hughes AD. The mechanism of action of alpha 2-adrenoceptors in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 1995 Aug; 115(8): 1463-1468.
- Pastor C, Badia A, Sabria J. Possible involvement of alpha-1 adrenoceptors in the modulation of [³H] noradrenaline release in rat brain cortical and hippocampal synaptosomes. *Neurosci Lett* 1996; 216:187-190.

- Passmore-JC; Hatton-DC; McCarron-DA. Dietary calcium decreases blood pressure without decreasing renal vascular resistance or altering the response to NO blockade. *J-Lab-Clin-Med.* 1997 Dec; 130(6): 627-34.
- Patil PN, Fudge K, Jacobowitz D. Steric aspects of adrenergic drugs XVIII. Alpha-adrenergic receptors of mammalian aorta. *Eur J Pharmacol* 1972; 19:79-87.
- Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, Smith DH, Ashkenazi A, Ramachandran J, Schimerlik MI, Capon DJ. Primary structure and biochemical properties of an M_2 muscarinic receptor. *Science* 1987; 236:600-605.
- Pérez DM, Piascik MT, Garham RM. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha-1D adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 1991; 40:876-883.
- Pérez DM, De Young MB, Graham RM. Coupling of expressed α_{1B} and α_{1D} -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol* 1993; 44:784-795.
- Pérez DM, Piascik MT, Malik N, Gaivin R, Graham RM. Cloning expression and tissue distribution of the rat homolog of the bovine $\alpha_{1?}$ -adrenergic receptor provide evidence for its classification as the $\alpha_{1?}$ -subtype. *Mol Pharmacol* 1994; 46:823-831.
- Pérez DM, Piascik MT, Garham RM. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha-1D adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 1991; 40:876-883.
- Pernot F, Schleiffer R, Bergmann C, Vincent M, Assard J, Gairard A. Dietary calcium, vascular reactivity, and genetic hypertension in the Lyon rat strain. *Am J Hypertens* 1990b; 3:846-853.
- Pernot F, Schleiffer R, Vincent M, Assard J, Gairard A. Parathyroidectomy in the Lyon hypertensive rat: cardiovascular reactivity and aortic responsiveness. *J Hypertens* 1990a; 8:1111-1117.
- Pettinger WA, Keeton TK, Campbell WB, Harper DC. Evidence for a renal alpha-adrenergic receptor inhibiting renin release. *Circ Res* 1976 May; 38(5): 338-346.
- Pettinger WA. Unusual alpha adrenergic receptor potency of methyl dopa metabolites on melanocyte function. *J Pharmacol Exp Ther* 1977 Jun; 201(3): 622-626.
- Peuler JD, Mark AL. Aggravation of salt-induced hypertension in Dahl rats by 2% supplement dietary calcium. *Hypertension* 1989; 13:929-934.
- Philipp T, Distler A, Cordes U. Sympathetic nervous system and blood pressure control in essential hypertension. *Lancet* 1978; 2:959-963.
- Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Pérez DM. The specific contribution of the novel α_{1D} -adrenoceptor in the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:1583-1589.
- Piascik MT, Kusiak JW, Barron KW. α_1 -adrenoceptor subtypes and the regulation of peripheral hemodynamics in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 1990; 186:273-278.
- Piascik MT, Smith MS, Soltis EE, Pérez DM. Identification of the mRNA for the novel α_{1D} and two other α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1994; 46:30-40.
- Pihlavisto M, Sjöholm B, Scheinin M, Wurster S. Modulation of agonist binding to recombinant human α_2 -adrenoceptors by sodium ions. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448(1):135-146.
- Pichler L, Kobinger W. Presynaptic activity at peripheral adrenergic sites and blood pressure effect of alpha-adrenoceptor stimulating drugs. *Eur J Pharmacol* 1978 Dec 1; 52(3-4):287-295.
- Pichler L, Kobinger W. Centrally mediated cardiovascular effects of B-HT 920

(6-allyl-2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4H-thiazolo-[4,5-d]-zepinedihydrochloride), a hypotensive agent of the "clonidine type". *J Cardiovasc Pharmacol* 1981a; Mar-Apr; 3(2): 3:269-277.

-Pichler L, Kobinger W. Modulation of motor activity by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor stimulation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981b; 317:180-182.

-Pohjanoksa K, Jansson CC, Luomala K, Marjamaki A, Savola JM, Scheinin M. Alpha2-adrenoceptor regulation of adenylyl cyclase in CHO cells: dependence on receptor density, receptor subtype and current activity of adenylyl cyclase. *Eur J Pharmacol* 1997; 335(1):53-63.

- Poole, T.B., 1987. The laboratory rat. In: TB Poole (ed) *Handbook on the care and management of laboratory rat*, 6 Ed., UFAW. England, Longman Scientific & Technical; 19, pp 309-331.

-Pomerleau F, Fournier A, Cadieux A. Mouse aorta: a preparation highly sensitive to the vasodilatory action of CGRP. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30(3):343-351.

-Porsti I. Arterial smooth muscle contractions in spontaneously hypertensive rats on a high-calcium diet. *J Hypertens* 1992; 10:255-263.

-Porsti I, Arvola P, Wuorela H, Ilkka M, Saynavalammi P, Huhtala H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H. Effects of a high calcium diet and deoxycorticosterone on vascular smooth muscle responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990a; 8:835-841.

-Porsti I, Wuorela H, Arvola P, Saynavalammi P, Nurmi AK, Huhtala H, Laippala P, Metsa-Ketela T, vapaatalo H. Effects of calcium and deoxycorticosterone on blood pressure, plasma renin activity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1990b; 12:1159-1174.

-Porsti I, Arvola P, Wuorela H, Vapaatalo H. High calcium diet augments vascular potassium relaxation in hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19:85-92.

-Postnov YV, Orlov SN, Kravtsov GM, Gulak PV. Calcium transport and protein content in cell plasma membranes of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6:S21-S27.

-Poulat, T., Couture, R. Increased pulmonary vascular permeability and edema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* 1998; 344(2-3):251-259.

-Price DT, Chari RS, Berkowitz DE, Meyers W, Schwinn DA. Expression of α_1 -adrenergic receptor subtype mRNA in adult rat tissue and human SK-N-MC neuronal cells: implications of α_1 -adrenergic receptor subtype classification. *Mol Pharmacol* 1994; 46:221-226.

-Pryer J, Cappuccio FP, Elliott P. Dietary calcium and blood pressure: a review of the observational studies. *J Hum Hypertens* 1995; 9:597-604.

-Puerro M, Aleixandre MA. α Pressor effect in pithed hypocalcemic rats. *Pharmacol Comm* 1994;4(2):85-95.

-Puerro M, Aleixandre MA. Demonstration of the alpha-vasoconstriction lowering effect of calcium in the pithed rat. *J Vasc Res* 1993; 30:303-308.

-Putney JW. Calcium-mobilizing receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8:481-486.

-Putney JW, Bird GS. The inositol phosphate-calcium signalling system in non-excitable cells. *Endocrine Rev* 1993; 14:611-631.

-Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K^+ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol* 1994; 475:9-13.

-Racle JP. Intrathecal and epidural administration of alpha adrenergic receptor agonists. *Ann Fr Anesth Reanim* 1990; 9(4):338-345. review.

- Raddino R, Pela G, Manca C, Barbagallo M, D'Aloia A, Passeri M, Visioli O. Mechanism of action of human calcitonin gene-related peptide in rabbit heart and in human mammary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29(4):463-470.
- Raiteri M, Bonnano G, Maura G, Pende M, Andrioli GC, Ruelle A. Subclassification of release-regulating α_2 -autoreceptors in human brain cortex. *Br J Pharmacol* 1992; 107:1146-1151.
- Rao-RM; Yan-Y; Wu-Y. Dietary calcium reduces blood pressure, parathyroid hormone, and platelet cytosolic calcium responses in spontaneously hypertensive rats. *Am-J-Hypertens.* 1994 Dec; 7(12): 1052-7.
- Rasmussen H, Forder J, Kajima I, Scriabine A. TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122:776-784.
- Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6301-6305.
- Reid JL. The clinical pharmacology of clonidine and related central antihypertensive agents. *Br J Pharmacol* 1981; 12:295-302.
- Reid JL, Dargie HJ, Davies DS, Wing LMH, Hamilton CA, Dollery CT. Clonidine withdrawal in hypertension. *Lancet* 1977; i:1171-1174.
- Reid JL, Rubin PC, Howden CW. Central α_2 -adrenoceptors and blood pressure regulation in man: studies with guanfacine (BS 100-141) and azepexole (B-HT 933). *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15(Suppl 4):463-469.
- Resink-TJ; Scott-Burden-T; Baur-U; Buhler-FR. Increased proliferation rate and phosphoinositide turnover in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 1987 Dec; 5(5): S145-S148.
- Resnick LM. Uniformity and diversity of calcium metabolism in hypertension: a conceptual framework. *Am J Med* 1987; 2:16-26.
- Resnick LM. Calcitropic hormones in human and experimental hypertension. *Am J Hypertens* 1990; 3:171S-178S.
- Resnick LM. Calcium metabolism in hypertension and allied metabolic disorders. *Diabetes Care* 1991; 14:505-520.
- Resnick LM. Calcium metabolism in hypertension: a cellular hypothesis. Simposio sobre hipertensión y calcio. Análisis de sus relaciones epidemiológicas, fisiopatológicas y terapéuticas 1994: 6-7.
- Resnick LM. The role of dietary calcium in hypertension: a hierarchical overview. *Am J Hypertens* 1999 Jan; 12(1 Pt 1): 99-112.
- Resnick LM, Laragh JH. Renin, calcium and pathophysiologic basis of antihypertensive therapy. *Am J Cardiol* 1985; 56:68H-74H.
- Resnick LM, Laragh JH, Sealey JE, Alderman MH. Divalent cations in essential hypertension. Relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. *N Engl J Med* 1983 Oct 13; 309(15): 888-891.
- Reynen PH, Martin GR, Eglen RM, MacLennan SJ. Characterization of human recombinant α_2A -adrenoceptors expressed in Chinese hamster lung cells using intracellular Ca^{2+} changes: evidence for cross-talk between recombinant α_2A - and native α_1 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2000 Apr; 129(7):1339-1346.

- Rhodes KF, Waterfall YF. The effects of some alpha-adrenoceptor antagonists on the responses of the canine saphenous vein to B-HT 933, UK-14304 and methoxamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 335:261-268.
- Ricci D, Taira CA. Adrenoceptor involvement in the cardiovascular responses to B-HT 920 in sinoaortic denervated rats. *Gen Pharmacol* 1999; 32(1):29-34.
- Richer C, Lefevre-Borg F, Lechaire J, Gomeni C, Jomeni R, Givdicelli J, Cavero I. Systemic and regional hemodynamic characterization of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonists in pithed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240(3):944-953.
- Riek RP, Handschumacher MK, Sung S-S, Tan M, Glynias MJ, Schluchter MD, Novotney J, Graham RM. Evolutionary conservation of both the hydrophilic and hydrophobic nature of transmembrane residues. *J Ther Biol* 1995; 172:245-258.
- Rinaldi G, Bohr DF. Dietary calcium on vascular reactivity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1992; 100:375-383.
- Roberts RE, Tomlinson AE, Kendall DA, Wilson VG. Alpha2-adrenoceptor-mediated contractions of the porcine isolated ear artery: evidence for a cyclic AMP-dependent and a cyclic AMP-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 1998 Jul; 124(6):1107-1114.
- Roca-Cusachs A, Dipette DJ, Carson J, Graham GA, Holland OB. Systemic and regional hemodynamic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration. *J Hypertens* 1992; 10:939-947.
- Rokosh DG, Bailey BA, Stewart AFR, Karns LR, Long CS, Simpson PC. Distribution of α_{1C} -adrenergic receptor mRNA in rat adult tissue by RNase protection assay and comparison with α_{1B} and α_{1D} . *Biophys Res Commun* 1994; 200: 1177-1184.
- Rosen SG, Berk MA, Popp DA, Serusclat P, Smith EB, Shah SD. α - and β -Adrenergic receptors and receptor coupling to adenylate cyclase in human mononuclear leukocytes and platelets in relation to physiological variations of sex steroids. *J Clin Endocr Metab* 1984; 58:1068-1076.
- Rostand SG, Druke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999 Aug; 56(2): 383-392.
- Roullet CM, Roullet JB, Martin AS, McCarron DA. In vivo effect of calcitriol on calcium transport and calcium binding proteins in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1994 Aug; 24(2): 176-182.
- Ruan XZ; Varghese Z; Fernando R; Moorhead JF. Cytokine regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells. *Nephrol-Dial-Transplant*. 1998 Jun; 13(6): 1391-1397.
- Ruffolo RRJr. Spare α -adrenoceptors in the peripheral circulation: excitation contraction coupling. *Fedn Proc* 1986; 45:2341-2346.
- Ruffolo RRJr, Hieble JP. α -Adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 1994; 61:1-64.
- Ruffolo RRJr, Yaden EL. Existence of spare alpha 1-adrenoreceptors, but not alpha2-adrenoreceptors, for respective vasopressor effects of cirazoline and B-HT 933 in the pithed rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984; 6(6): 1011-1019.
- Ruffolo RRJr, Morgan EL, Messick K. 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* 1984 Sep; 230(3): 587-594.
- Ruffolo RR Jr, Waddell JE, Yaden EL. 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* 1981 May; 217(2): 235-240.

- Ruffolo RRJr, Waddell JE, Yaden EL. Heterogeneity of postsynaptic Alpha adrenergic receptors in mammalian aortas. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; May; 221(2):309-314.
- Ruffolo RRJr, Yaden EL, Waddell JE. Receptor interactions of imidazolines. V?. Clonidine differentiates postsynaptic α -adrenergic receptor subtypes in tissues from rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213:557-561.
- Rump LC, Bohmann C, Schaible U, Schollhor J, Limberger N. α_{2C} -Adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium. *Br J Pharmacol* 1995; 116:2617-2624.
- Sacks-FM; Willett-WC; Smith-A; Brown-LE; Rosner-B; Moore-TJ Effect on blood pressure of potassium, calcium, and magnesium in women with low habitual intake. *Hypertension*. 1998 Jan; 31(1): 131-138.
- Saito-K; Sano-H; Furuta-Y; Fukuzaki-H Effect of oral calcium on blood pressure response in salt-loaded borderline hypertensive patients. *Hypertension* 1989 Mar; 13(3): 219-226.
- Saito K, Sano H, Furuta Y, Yamanishi J, Omatsu T, Ito Y, Fukuzaki H. Calcium supplementation in salt-dependent hypertension. *Contrib Nephrol* 1991; 90:25-35.
- Salmon D, Honeyman T. Proposed mechanisms of cholinergic action in smooth muscle. *Nature* 1980; 284:344-345.
- Sanchez A, Vidal MJ, Martinez Sierra R, Saiz J. Ontogeny of renal alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 Jun; 237(3): 972-979.
- Sanchez A, Torres A, Saiz J. Renal alpha-adrenoceptor density and blood pressure in SHR rats exposed chronically to prazosin and/or yohimbine. *Clin Exp Hypertens A* 1989; 11(1): 119-136.
- Sanchez A, Lara B, Saiz J. Altered renal alpha-adrenoceptor density induced by prolonged NaCl and DOCA administration in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990 Jun; 15(6): 857-861.
- Sanchez M, de la Sierra A, Coca A, Poch E, Giner V, Urbano-Marquez A. Oral calcium supplementation reduces intraplatelet free calcium concentration and insulin resistance in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1997 Jan; 29(1 Pt 2): 531-536.
- Sandow SL, Hill CE. Physiological and anatomical studies of the development of the sympathetic innervation to rat iris arterioles. *J Auton Nerv Syst* 1999; 77(2-3):152-163.
- Sato E, Narimatsu A, Hosohata Y, Tsuchihashi H, Nagatomo T. The affinity of betaxolol, a beta 1-adrenoceptor-selective blocking agent, for beta-adrenoceptors in the bovine trachea and heart. *Br J Pharmacol* 1993 Feb; 108(2):484-489.
- Saussy DL, Goetz AS, King HK, True TA. BMY 7378 is selective antagonist of α_{1D} -adrenoceptors: further evidence that vascular α -adrenoceptors are of the α_{1D} -subtype. *Can J Pharmacol* 1994; 72(suppl 1): 323. Abstract.;
- Savontaus E, Pesonen U, Rouru J, Huupponen R, Koulu M. Effects of ZD7114, a selective beta3-adrenoceptor agonist, on neuroendocrine mechanisms controlling energy balance. *Eur J Pharmacol* 1998 Apr 24; 347(2-3):265-274.
- Sawutz DG, Lanier SM, Warren CD, Graham RM. Glycosylation of mammalian α_1 -adrenergic receptor by complex type N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol* 1987; 32:565-571.
- Sayet I, Neuilly G, Rakotoarisoa L, Mironneau C, Mironneau J. Relation between alpha 1-adrenoceptor subtypes and noradrenaline-induced contraction in rat portal vein smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1993 Sep; 110(1): 207-212.
- Schiffli H, Sitter T, Lang SM. Noradrenergic blood pressure dysregulation and cytosolic calcium in primary hyperparathyroidism. *Kidney Blood Press Res* 1997; 20(5): 290-296.

- Schoffeleers AN, Mulder AH. [3H]noradrenaline release from brain slices induced by an increase in the intracellular sodium concentration: role of intracellular calcium stores. *J Neurochem* 1983 Mar; 40(3):615-621.
- Scroggin, K.E., Hatton, D.C., McCarron, D.A. Effects of dietary sodium and calcium on blood pressure reactivity in the SHR and WKY. *Clin Exp Hypertens* 1991a; 13:699-707.
- Scroggin KE, Hatton DC, McCarron DA. The interactive effects of dietary sodium chloride and calcium on cardiovascular stress responses. *Am J Physiol* 1991b; 261:R945-R949.
- Schachter M, Luszick J, Jager B, Verboom C, Sohlke E. Safety and tolerability of monoxidine in the treatment of hypertension. *Drug Saf* 1998; 19(3):191-203.
- Schleiffer R, Berthelot A, Gairard A. Action of parathyroid extraction on arterial blood pressure and on contraction and ⁴⁵Ca exchange in isolated aorta of the rat. *Eur J Pharmacol* 1979; 58:163-167.
- Schleiffer R. Involvement of parathyroid hormone (PTH) in genetic models of hypertension. *J Endocrinol Invest* 1992a; 15(9 Suppl 6): 87-95.
- Schleiffer R. Parathyroid hormone and genetic hypertension. *Int J Cardiol* 1992b Jun; 35(3): 303-310.
- Schimmel, R.J. Roles of α - and β -adrenoceptors in the control of glucose oxidation in hamster epididymal adipocytes. *Biochem Biophys Acta* 1976; 428:379-387.
- Schmitt H. Actions of alpha-sympathomimetics on nervous structures. *Actual Pharmacol Paris*. 1971; 24: 93-131.
- Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA. Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Exp Ther* 1981 Nov; 219(2): 400-406.
- Schluter H, Quante C, Buchholz B, Dietl KH, Spieker C, Karas M, Zidek W. A vasopressor factor partially purified from human parathyroid glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188:323-329.
- Schluter KD; Goldberg Y; Taimor G; Schafer M; Piper HM. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc-Res*. 1998 Oct; 40(1): 174-181.
- Schultz G, Jakobs KH, Hofmann F. Action principles of hormones and neurotransmitters (author's transl) *Arzneimittelforschung* 1980; 30(11a):1981-1986.
- Schwartz DD. Activation of alpha-2 adrenergic receptors inhibits norepinephrine release by a pertussis toxin-insensitive pathway independent of changes in cytosolic calcium in cultured rat sympathetic neurones. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:248-255.
- Schwietert HR, Mathy MJ, Wilhelm D, Wilffert B, Pfaffendorf M, Van Zwieten PA. Alpha 1-adrenoceptor-mediated Ca(2+)-entry from the extracellular fluid and Ca(2+)-release from intracellular stores: no role for alpha 1A,B-adrenoceptor subtypes in the pithed rat. *J Auton Pharmacol* 1992 Jun; 12(3): 125-136.
- Schwinn DA; Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RTJr, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Cotecchia S. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* 1990;265:8183-8189.
- Schwinn DA, Lomasney JW. Pharmacological characterization of cloned α_1 -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype. *Eur Journ of Pharmacol* 1992; 227:433-436.
- Schwinn DA, Page SO, Middleton JP, Lorenz W, Liggett SB, Yamamoto K, Lapetina EG, Caron MG, Lefkowitz RJ, Cotecchia S. The α_{1C} -adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol Pharmacol* 1991; 40:619-626.

- Scrogin KE, Hatton DC, McCarron DA. Effects of dietary sodium and calcium on blood pressure reactivity in the SHR and WKY. *Clin Exp Hypertens* 1991a; 13:699-707.
- Scrogin KE, Hatton DC, McCarron DA. The interactive effects of dietary sodium chloride and calcium on cardiovascular stress responses. *Am J Physiol* 1991b; 261:R945-R949.
- Segawa T, Ito H, Inoue K, Wada H, Minatoguchi S, Fujiwara H. Dopamine releases endothelium-derived relaxing factor via alpha 2-adrenoceptors in canine vessels: comparisons between femoral arteries and veins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25(9):669-675.
- Segstro R, Greenway C. Alpha adrenoceptor subtype mediating sympathetic mobilization of blood from the hepatic venous system in anaesthetized cats. *J Pharmac Exp Ther* 1986; 236:224-229.
- Shapiro E, Mazouz B, Caine M. Alpha-2 adrenergic receptors in canine prostate: biochemical and functional correlations. *J Urol* 1987; 137:567-570.
- Shattil SJ, McDonough M, Tumbull J, Insel PA. Characterization of alpha-adrenergic receptors in human platelets using [3H]clonidine. *Mol Pharmacol* 1981 Jan; 19(1): 179-183.
- Shearman GT, Lal H, Ursillo RC. Effectiveness of lofexidine in blocking morphine-withdrawal signs in the rat. *Pharmac Biochem Behav* 1980; 12:573-575.
- Shreeve SM. Characterization of bovine aortic alpha-1 adrenoceptors by criteria of ligand affinity and molecular mass. *J Pharmac Exp* 1988; 245:1060-1067.
- Shibata K, Hirasawa A, Moriyama N, Kawabe K, Ogawa S, Tsujimoto G. α_{1a} -Adrenoceptor polymorphism: pharmacological characterization and association with benign prostatic hypertrophy. *Br J Pharmacol* 1996; 118:1403-1408.
- Shibata K, Fogler R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S, Tsujimoto G. KMD-3213, a novel, potent, α_{1a} -adrenoceptor selective antagonist: characterization using recombinant human α_1 -adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol* 1995;48:250-258.
- Shimura H, Endo T, Onaya T. Thyrothrin increases the α_{1b} -adrenergic receptors in rat thyroid gland in vivo. *J Endocrinol* 1990; 126:317-322.
- Silver PJ, Cumiskey WR, Harris AL. Vascular protein kinase C in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1992 Mar 3; 212(2-3): 143-149.
- Simavorian PS, Martirosian OM, Shirinian EA. [The reactivity of postsynaptic alpha 1- and alpha 2-adrenoreceptors and arterial pressure in acute pancreatitis]. *Patol Fiziol Eksp Ter* 1990 Mar-Apr; (2): 20-22.
- Simmoneauz V, Ebadi M, Bylund DB. Identification and characterization of alpha-2D adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol Pharmacol* 1991; 40:235-241.
- Sleight AJ, Koek W, Bigg DC. Binding of antipsychotic drugs at alpha 1A- and alpha 1B-adrenoceptors: risperidone is selective for the alpha 1B-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1993; 238:407-410.
- Schiffel H, Kuchle C, Lang S. Dietary salt, intracellular ion homeostasis and hypertension secondary to early-stage kidney disease. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22 (1-3):178-181.
- Shibley RE, Tilden JH. A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proc Soc Exp Biol Med* 1947;64(1):453-5.
- Stjarne L, Bartfai T, Alberts P. The influence of 8-Br 3', 5'-cyclic nucleotide analogs and of inhibitors of 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, on noradrenaline secretion and neuromuscular transmission in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979 Aug; 308(2):99-105.

- Stjarne L. Facilitation and receptor-mediated regulation of noradrenaline secretion by control of recruitment of varicosities as well as by control of electro-secretory coupling. *Neuroscience* 1978; 3(12):1147-1155.
- Smith PH, Porte D. Neuropharmacology of the pancreatic islets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1976; 16:269-285.
- Smith K, Docherty JR. Are the prejunctional α_2 -adrenoceptors of the rat vas deferens and submandibular gland of the α_{2A} - or α_{2D} -subtype?. *Eur J Pharmacol* 1992; 219:203-210.
- Smith K, Connaughton S, Docherty JR. Investigations of prejunctional α_2 -adrenoceptors in rat atrium, vas deferens and submandibular gland. *Eur J Pharmacol* 1992; 211:251-256.
- Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the development stage of spontaneously hypertension in the unanaesthetized rat. *Hypertension* 1979; 1:508-517.
- Smith KM, MacMillan JB, McGrath JC. Investigation of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in rabbit cutaneous resistance arteries. *Br J pharmacol* 1997; 122:825-832.
- Smyth DD, Umemura S, Pettinger WA. α -Adrenoceptor antagonism of vasopressin-induced changes in sodium excretion. *Am J Physiol* 1985; 248:F767-F772.
- Smyth DD, Umemura S, Pettinger WA. Renal alpha 2-adrenergic receptors multiply and mediate sodium retention after prazosin treatment. *Hypertension* 1986 Apr; 8(4): 323-331.
- Somogyi GT, Tanowitz M, De Groat WC. Prejunctional facilitatory alpha-1 adrenoceptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1995; 114:1710-1716.
- Somogyi GT, Tanowitz M, Zernova G, De Groat WC. M_1 muscarinic receptor-induced facilitation of Ach and noradrenaline release in the rat bladder is mediated by protein Kinase C. *J Physiol* 1996; 496:245-254.
- Stähle H. Clonidine. In: Bindra JS, Lednicer D (eds) *Chronicles of drug discovery*, vol 1. Wiley, New York, p87.
- Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N, Coughlin SR, Lee WM, Escobedo JA; Williams LT. Acardiac myocytic hypertrophy is associated with *c-myc* protooncogene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8348-8350.
- Starke K. α -Sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972a; 274:18-45.
- Starke K. Influence of extracellular noradrenaline on the stimulation-evoked secretion of noradrenaline from sympathetic nerves: evidence for an α -adrenoceptor mediated feed-back inhibition of noradrenaline release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972b; 275:11-23.
- Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77:1-124.
- Starke K. Alpha-adrenoceptor subclassification. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1981a; 88:199-236.
- Starke K. Presynaptic receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1981b; 21:7-30.
- Starke K, Endo T, Taube HD. Relative pre- and postsynaptic potencies of α -adrenoceptor agonist in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1975; 291:55-78.
- Starke, K.; Langer, S.Z. 1979 In "Presynaptic Receptors, Advances in teh Biosciences" S.Z: Langer, K. Starke and M.L. Dubocovich, eds), Vol. 18, pp. 1-3. Pergamon Press, Oxford.

- Starke K, Montel H, Gayk W, Merker R. Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmac* 1974; 291:55-78.
- Starke K, Montel H, Schumann HJ. Influence of cocaine and phenoxybenamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmac* 1971a; 270:210-214.
- Starke K, Montel H, Wagner J. Effect of phentolamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmac* 1971b; 271:181-192.
- Stassen FR, Willemsen MJ, Janssen GM, DeMey JG. Alpha -adrenoceptor subtypes in rat aorta and mesenteric small arteries are preserved during left ventricular dysfunction post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 33(3):706-713.
- Steele TH, Underwood JL. Blunted norepinephrine natriuresis in the isolated spontaneously hypertensive rat kidney. *Am J Physiol* 1978 Nov; 235(5): F425-F429.
- Stern N, Golub M, Nyby M, Berger M, Egena P, Lee DBN, Tuck ML, Brickman AS. Effect of high calcium intake on pressor responsivity in hypertensive rats. *Am J Physiol* 1987; 252 (Heart Circ Physiol 21):H1112-H1119.
- Stern N, Lee DB, Silis V, Beck FW, Deftos L, Manolagas SC, Sowers JR. Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 1984 Sep-Oct; 6(5):639-646.
- Stevens MJ, Moulds RFW. Antagonism by nifedipine of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor mediated responses of human digital arteries. *J PharmacolExp Ther* 1986; 236:764-769.
- Stevens MJ, Moulds RFW. Neuronally-released norepinephrine does not preferentially activate postjunctional alpha-adrenoceptors in human blood vessels in vitro. *Circ Res* 1985; 57:399-406.
- Storm-DS; Turla-MB; Todd-KM; Webb-RC. Calcium and contractile responses to phorbol esters and the calcium channel agonist, Bay K 8644, in arteries from hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1990 Aug; 3(8 Pt 2): 245S-248S.
- Strader CD; Sigal IS; Dixon RAF. Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 1989; 3:1825-1832.
- Strazzullo P, Galletti F, Cirillo M, Siani A, Nunziata V, Giannattasio R, Mancini M. Altered extracellular calcium homeostasis in essential hypertension: a consequence of abnormal cell calcium handling. *Clin Sci* 1986 Sep; 71(3):239-244.
- Striessnig-J; Murphy-BJ; Catterall-WA. Dihydropyridine receptor of L-type Ca^{2+} channels: identification of binding domains for [3H](+)-PN200-110 and [3H]azidopine within the alpha 1 subunit. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 1991 Dec 1; 88(23): 10769-73.
- Strosberg-AD; Pietri-Rouxel-F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor [see comments]. *Trends-Pharmacol-Sci*. 1996 Oct; 17(10): 373-81.
- Struthers AD, Beacham JL, Brown MJ, Macdonald DWR, MacIntyre I, Morris HR, Stevenson JC. Human calcitonin gene related peptide - a potent endogenous vasodilator in man. *Clin Sci* 1986; 70:389-393.
- Struyker Boudier HAJ. Catecholamine Receptor innervous tissue. PhD Thesis, University of Nijmegen, The Netherlands (1975).
- Suematsu E, Hirata M, Sasguri T, Hashimoto T, Kuriyama H. Roles of Ca on the inositol 1,4,5-triphosphate-induced release of Ca^{2+} from saponin-permeabilized single cells of the porcine coronary artery. *Comp Biochem Physiol* 1985; 82:645-649.
- Sugiyama K, Kitazawa Y, Kawai K. Apraclonidine effects of ocular responses to YAG laser irradiation to the rabbit iris. *Invest Ophthal Vis Sci* 1990; 31:708-714.

- Sullivan AT, Drew GM. Pharmacological characterization of pre-and postsynaptic alpha-adrenoceptors in dog saphenous vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980; 314(3):249-258.
- Sumikura T, Yuasa S, Miki S, Yura T, Takahashi N, Shoki T, Uchida K, Fujioka H, Fujita Y, Matsuo H. Effect of low calcium diet on blood pressure and pressure natriuresis response in rats: role of the renin-angiotensin system. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1994; 36:702-708
- Supowit SC, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ. Calcitonin gene-related peptide is a depressor of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 1997 Apr; 29(4): 945-950.
- Sutoo D, Matsukura T, Akiyama K. Effect of intraventricular administration of calcium and calmodulin antagonist on the blood pressure in the rat. *Neurosci Lett* 1987; 82:297.
- Sutoo D, Matsukura T, Akiyama K. The mechanism by which calcium reduces blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1988; 155:189-192.
- Sutoo D, Akiyama K, Geffard M. Central dopamine-synthesis regulation by the calcium-calmodulin-dependent system. *Brain Res Bull* 1989; 22:565-569.
- Sutoo D, Akiyama K, Yabe K, Kohno K. Multiple analysis of tyrosine hydroxylase and calmodulin distributions in the forebrain of the rat using a microphotometry system. *Brain Res Bull* 1991; 26(6):973-982.
- Sutoo D, Akiyama K, Matsukura T, Nakamoto RK. Decrease of central dopamine level in the adult spontaneously hypertensive rats related to the calcium metabolism disorder. *Brain Res Bull* 1993; 30(1-2):107-113.
- Sutoo D, Akiyama K, Takita H. Hypertension in epileptic mice: a phenomenon related to reduction of Ca(2+)-dependent catecholamine synthesis in the brain. *Eur J Pharmacol* 1995 May 4; 278(1): 33-37.
- Sutoo D, Akiyama K. Regulation of blood pressure with calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain and its related phenomena. *Brain Res Brain Res Rev* 1997 Sep 30; 25(1): 1-26.
- Suzuki E; Tsujimoto G; Tamura K; Hashimoto K. Two pharmacologically distinct alpha 1-adrenoceptor subtypes in the contraction of rabbit aorta: each subtype couples with a different Ca²⁺ signalling mechanism and plays a different physiological role. *Mol Pharmacol* 1990 Nov; 38(5): 725-736.
- Svensson SP, Bailey TJ, Porter AC, Richman JG, Regan JW. Heterologous expression of the cloned guinea pig alpha 2A, alpha 2B, and alpha 2C adrenoceptor subtypes. Radioligand binding and functional coupling to a cAMP-responsive reporter gene. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:291-300.
- Taberero A, Vila E. Effect of age on noradrenaline response in tail artery and aorta: role of endothelium. *J Auton Pharmacol* 1995; 15:327-333.
- Taberero A, Vivas NM, Vila E. Sources of calcium and alpha 1-adrenoceptor-mediated contraction in rat tail artery. *Br J Pharmacol*. 1996 Aug; 118(8): 2067-2072.
- Tabrizchi R, Triggle CR. Pressor responses to the alpha 1-adrenoceptor agonist cirazoline: effects of captopril, phenoxybenzamine and nifedipine. *Eur J Pharmacol* 1994 Jan 4; 251(1):15-20.
- Taguchi K, Yang M, Goepel M, Michel MC. Comparison of human alpha1-adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998 Feb; 357(2): 100-110.
- Tai CY, Smith QR, Rapoport SI. Calcium influxes into brain and cerebrospinal fluid are linearly related to plasma ionized calcium concentration. *Brain Res* 1986; 385:227-236.
- Takata Y, Kato H. Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life Sci* 1996; 58(2):91-106.

- Takatori K, Ogura T, Katayama E, Ota Z, Mizukawa K, Ogawa N. Autoradiographic localization and computerized quantification of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in spontaneously hypertensive rat kidney: [3H]bunazosin and [3H]yohimbine binding studies. *J Int Med Res* 1991 Mar-Apr; 19(2): 153-160.
- Takayanagi I, Koike K, Satoh M, Okayasu A. Drug receptor mechanisms in smooth muscle: beta-chloroethylamine-sensitive and -resistant receptor mechanisms. *Jpn J Pharmacol* 1997 Jan; 73(1): 1-22.
- Taneike T, Kitazawa T, Funakura H, Asanuma K, Tsuji S, Yamada M, Teraoka H, Ohga A. Smooth muscle layer-specific variations in the autonomic innervation of bovine myometrium. *Gen Pharmacol* 1999; 32(1):91-100.
- Taniguchi N, Ukai Y, Tanaka J, Kimura K, Moriyama N, Kawabe K. Identification of alpha1-adrenoceptor subtypes in the human prostatic urethra. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355(3):412-416.
- Teng CM, Guh JH, Ko FN. Functional identification of α_1 -adrenoceptor subtypes in human prostate: comparison with those in rat vas deferens and spleen. *Eur J Pharmacol* 1994; 265:61-66.
- Tenner-TE Jr; Buddingh-F; Yang-ML; Yang-CM; Pang-PK. Dietary calcium and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Magnesium*. 1989; 8(5-6): 288-98.
- Terman BI, Riek RP, Grodski A, Hess HJ, Graham RM. Identification and structural characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1990; 37:526-534.
- Thoenen H, Hürlimann A, Haefele W. Wirkungen von phenoxybenzamine, phentolamine and azapetin auf adrenergische synapsender katzenmilz. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1964; Acta 22:148-161.
- Thoolen MJMC, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Cardiovascular effects of withdrawal of some centrally acting antihypertensive drugs in the rat. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15:491S-505S.
- Timmermans PB, Thoolen MJMC. 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 Pharmacol* 1987; 140:133-142.
- Timmermans PB, Van Zwieten PA. 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 933. *Eur J Pharmacol* 1980; 63:199-202.
- Timmermans PB, Van Zwieten PA. The postsynaptic alpha-2 adrenoceptor. *J Auton Pharmacol* 1981; 1:171-183.
- Timmermans PB; Van Zwieten PA. Alpha-2 adrenoceptors: classification, localization, mechanisms and targets for drugs. *J Med Chem* 1982; 25:1389-1401.
- Timmermans PB, Beckeringh JJ, Van Zwieten PA, Thoolen MJMC. Sensivity of alpha-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* 1987; 240(3):864-870.
- Timmermans PB, De Jonge A, Van Meel JCA, Mathy MJ, Van Zwieten PA: Influence of nifedipine on functional responses in vivo initiated at alpha 2-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:1-11.
- Timmermans PB, De Jonge A, Van Meel JCA, Slothorst-Grisdijk FP, Lam E, Van Zwieten PA. Characterization of alpha-adrenoceptor populations. Quantitative relationships between cardiovascular effects initiated at central and peripheral alpha-adrenoceptors. *J Med Chem* 1981b; 24:502-507.
- Timmermans PB, De Jonge A, Van Zwieten PA, de Boer JJ, Speckamp NW Two clonidine-like compounds with substituents at the 2-, 3-, and 6-position of the phenyl ring possessing pronounced hypotensive potencies. *J Med Chem* 1982; 25(10):1122-1123.

- Timmermans PB, Van-Meel JC, Van-Zwieten PA. Evaluation of the selectivity of alpha-adrenoreceptor blocking drugs for postsynaptic alpha 1- and alpha 2-adrenoreceptors in a simple animal model. *J Auton Pharmacol* 1980 Nov; 1(1): 53-60.
- Timmermans PB, Karamat Ali F, Kwa HY, Schoop AMC, Slothorst-Grisdijk FP, Van Zwieten PA. Identical antagonist selectivity of central and peripheral alpha 1-adrenoceptors. *Molec Pharmacol* 1981c; 20:295-301.
- Timmermans PB, Schoop AMC, Kwa HY, Van Zwieten PA. Characterization of alpha-adrenoceptors participating in the central hypotensive and sedative effects of clonidine using yohimbine, rauwolscine and corynanthine. *Eur J Pharmacol* 1981a; Mar 5; 70(1):7-15.
- Timmermans JAM, Thien T, Smits P, Van Os CH. Quantification of Ca²⁺ ATPase in erythrocytes from subjects with essential hypertension and Raynauds phenomenon. *Am J Hypertens* 1994; 7:90-95.
- Togari A, Arai M, Shamoto T, Matsumoto S, Nagatsu T. Elevation of blood pressure in young rats fed a low calcium diet. Effects of nifedipine and captopril. *Biochemical Pharmacology* 1989; 38:889-893.
- Tomobe YI, Ishikawa T, Goto K. Enhanced endothelium-independent vasodilator response to calcitonin gene-related peptide in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1998; 351(3):351-355.
- Tong YC, Cheng JT. Subtyping of alpha 1-adrenoceptors responsible for the contractile response in the rat corpus cavernosum. *Neurosci Lett* 1997; 228(3):159-162.
- Tordoff MG, Pilchak DM, Hughes RL. Independence of salt intake induced by calcium deprivation from the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Physiol* 1993; 264 (3 Pt2):R492-R499.
- Trendelenberg AU, Limberger N, Starke K. Presynaptic α_2 -autoreceptors in brain cortex: α_{2D} in the rat and α_{2A} in the rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 348:35-45.
- Trendelenberg AU, Limberger N, Rumo LC. α_2 -Adrenergic receptors of the α_{2C} -subtype mediate inhibition of norepinephrine release in human kidney cortex. *Mol Pharmacol* 1994; 45:1168-1176.
- Triggle CR, Tabrizchi R. Alpha-mediated vasoconstriction: transmembrane signalling and receptor reclassification. *Adv Exp Med Biol* 1992; 311: 397-398.
- Tsujiimoto G, Timmins PV, Hoffman BB. α -adrenergic receptors in the rabbit bladder base smooth muscle: α_1 -adrenergic receptors mediate contractile responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236:384-389.
- Tyson C, Van de Zande H, Green H. Phospholipids as ionophores. *J Biol Chem* 1976; 251:1326-1332.
- Uchino K, Frohlich ED, Nishikimi T, Isshiki T, Kardon MB. Spontaneously hypertensive rats demonstrate increased renal vascular alpha 1-adrenergic receptor responsiveness. *Am J Physiol* 1991 May; 260(5 Pt 2): R889-R893.
- Ueda Y, Melchiorre C, Lippert B, Belleau B, Chona S, Triggle DJ. Molecular properties of the adrenergic alpha-receptor. I--Structural requirements for specific covalent occupancy by N,N'-bis-(5-aminopentyl)cystamine derivatives. *Farmac Sci*. 1978 Jul; 33(7): 479-495.
- Uehara Y, Ishimitsu T, Ishii M, Sugimoto T. Prostacyclin synthase and phospholipases in the vascular wall of experimental hypertensive rats. *Prostaglandins* 1987 Sep; 34(3): 423-432.
- Uehara Y, Ishii M, Ishimitsu T, Sugimoto T. Enhanced phospholipase C activity in the vascular wall of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1988 Jan; 11(1): 28-33.
- Uhlen S, Lindblom J, Johnson A, Wikberg JE. Autoradiographic studies of central alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptors in the rat using [3H]MK912 and subtype-selective drugs.

- Ullrich S, Wollheim CB. Islet cyclic AMP levels are not lowered during α_2 -adrenergic inhibition of insulin release: studies with epinephrine and forskolin. *J Biol Chem* 1984; 259:4111-4115.
- Vallotton-MB; Gerber-Wicht-C; Dolci-W; Rivest-RW. Effect of different calcium channel blockers on angiotensin II- and vasopressin-induced prostacyclin biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc-Pharmacol*. 1990 Apr; 15(4): 598-603.
- Van Breemen C, Aaronson P, Loutzenhiser R, Meisheri K. Ca^{2+} movements in smooth muscle. *Chest* 1978; 78(Suppl.):157-165.
- Van Brummelen P, Verney P, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Preliminary evidence for a postsynaptic α_2 -adrenoceptor in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 15:134P-135P.
- Van de Graaf PH, Shankley NP, Black JW. Analysis of the effects of α_1 -adrenoceptor antagonists on noradrenaline-mediate contraction of rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1996; 118:1308-1316.
- Van Meel JC, De Jonge A, Kalkman HO, Wilffert B, Timmermans PB, Van Zwieten PA. Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic alpha 2-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981 Jul; 316(4): 288-293.
- Van Meel JCA, De Jonge A, Wilffert B, Kalkman HO, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Vascular smooth muscle contraction initiated by postsynaptic alpha 2-adrenoceptor activation is induced by an influx of extracellular calcium. *Eur J Pharmacol* 1981a; 69:205-208.
- Van Meel JCA, De Jonge A, Wilffert B, Kalkman HO, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic alpha 2-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981b; 316:288-293.
- Van Meel JCA, De Zoeten K, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Impairment by nifedipine of vasopressor responses to stimulation of postsynaptic alpha 2-adrenoreceptors in ganglion-blocked rabbits. Further evidence for the selective inhibition of postsynaptic alpha 2-adrenoreceptor-induced pressor responses by calcium antagonists. *J Auton Pharmacol* 1982b; 2:13-20.
- Van Meel JCA, Wilffert B, De Zoeten K, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. The inhibitory effect of newer calcium antagonists (nimodipine and PY-108-068) on vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic alpha 2-adrenoceptors. *Arch Int Pharmacodyn* 1982a; 260:206-217.
- Van Meel JCA, Timmermans PBMWM, Van Zwieten PA. Alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor stimulation in the isolated perfused hindquarters of the rat: an in vitro model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:580-585.
- Van Zwieten PA. Interaction between alpha and beta-adrenoceptor mediated cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8(4): S21-S28.
- Van Zwieten PA. Different types of centrally acting antihypertensive drugs. *Eur Heart Journal* 1992; 13(Suppl A):18-21.
- Van Zwieten PA; Timmermans PB. Centrally mediated hypotensive activity of B-HT 933 upon infusion via the cat's vertebral artery. *Pharmacology*. 1980; 21(5): 327-32
- Van Zwieten PA, Timmermans PBMWM. Central and peripheral α -adrenoceptors. Pharmacological aspects and clinical, potential. *Advances in drug research*, 1984; 13:210-254.
- Vanhoutte PM. Heterogeneity of postjunctional vascular alpha-adrenoceptors and handling of calcium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:591-596.
- Vanhoutte PM, Miller VM. Alpha₂-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med* 1989; 87(Suppl 3C):1S-5S.

- Vanhoutte PM, Rimelle TJ. Calcium and alpha-adrenoceptors in activation of smooth muscle. *J cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:S280-S286.
- Varani K, Gessi S, Caiazza A, Rastelli G, Postaluppi F, Borea PA. Platelet alpha₂-adrenoceptor alterations in patients with essential hypertension. *Br J clin Pharmacol* 1999; 47(2):167-172.
- Villalobos-Molina R, Ibarra M. Alpha 1-adrenoceptors mediating contractions in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* 1996; 298:257-263.
- Villalobos-Molina R, López-Guerreo JJ, Ibarra M. Alpha 1D and alpha-1^a-adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur J Pharmacol* 1997; 322:225-227.
- Villar R, Repke J, Belizan JM, Pareja G. Calcium supplementation reduces blood pressures during pregnancy: Results of a randomized controlled clinical trial. *Obstet Gynecol* 1987; 70:317-322.
- Vizi ES. Presynaptic modulation of neurochemical transmission. *Prog Neurobiol* 1979; 12(3-4):181-290.
- Vizi ES. Termination of transmitter release by stimulation of sodium-potassium activated ATPase. *J Physiol Lond* 1977 May; 267(2):261-280.
- Voigt MM, McCune SK, Kanterman RY, Felder CC. The rat α_2 -C4 adrenergic receptor gene encodes a novel pharmacological subtype. *FEBS Lett* 1991; 278:45-50.
- Vom-Dahl S, Bode JG, Reinehr RM, Monnighoff Y, Kubitz R, Haussinger D. Release of osmolytes from perfused rat liver on perivascular nerve stimulation. alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 1999; 29(1):195-204.
- Wada T, Hasegawa Y, Ono H. Characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in facilitation of rat spinal motoneuron activity. *Eur J Pharmacol* 1997; 340:45-52.
- Wahl CA, Trendelenburg AU, Starke K. Presynaptic alpha-2 autoreceptors in mouse heart atria: evidence for the alpha 2D subtype. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354:253-261.
- Wagner J, Schumann HJ, Knorr A, Rohm N, Reidemeister JC. Stimulation by adrenaline and dopamine but not by noradrenaline of myocardial alpha-adrenoceptors mediating positive inotropic effects in human atrial preparations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980; 312:99-102.
- Walland A. Inhibition of a somato-sympathetic reflex via peripheral presynaptic α -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1978; 47:211-221.
- Wang X, Han C, Fiscus RR. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) causes endothelium-dependent cyclic AMP, cyclic GMP and vasorelaxant responses in rat abdominal aorta. *Neuropeptides* 1991; 20:115-124.
- Washton AM, Resnick RB. Outpatient opiate detoxification with clonidine. *J Clin Psychiatric* 1982a; 43:39-41.
- Washton AM, Resnick RB, Perzel JF, Garwood J. Lofexidine, a clonidine analog effective in opiate withdrawal. *Lancet* 1982b; i:991-992.
- Weber MA. Discontinuation syndrome following cessation of treatment with clonidine and other antihypertensive agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2(Suppl 1):S73-S89.
- Weisshank RL, Zgombick JM, Macchi M, Adham N, Lichtblau H, Branchek TA, Hartig PR. Cloning, expression and pharmacological characterization of a human α_{2B} -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1990; 38:681-688.
- Weissman y Pileggi: Iones inorgánicos, en: *Química clínica Principios y Técnicas*. 2ª Ed 1980; 19:643-772

- Wetzel JM, Miao SW, Forray, C, Borden LAA, Branchek TA, Gluchoswski C. Discovery of α_{1A} -adrenergic receptor antagonists basal on the L-type Ca^{2+} channel antagonist nifedipine. *J Med Chem* 1995; 38:1579-1581.
- Wikberg J. Localization of adrenergic receptors in guinea pig ileum and rabbit jejunum to cholinergic neurons and to smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1977; 99:190-207.
- Wikberg JE. The pharmacological classification of adrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors and their mechanisms of action. *Acta-Physiol-Scand-Suppl.* 1979; 468:1-99.
- Witberg-Matsson A, Wikberg JE, Uhlen S. Identification of drugs subtype-selective for alpha 2A-, alpha 2B, and alpha 2C-adrenoceptors in the pig cerebellum and kidney cortex. *Eur J Pharmacol* 1995; 284(3):271-279.
- Willens EW, Trion M, de Vries P, Heiligers JP, Villalon CM, Saxena PR. Pharmacological evidence that alpha1- and alpha2-adrenoceptors mediate vasoconstriction of carotid arteriovenous anastomoses in anaesthetized pigs. *Br J Pharmacol* 1999; 127(5):1263-1271.
- Wilson SK. Peripheral alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors in three models of hypertension in rats: an in vitro autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther* 1991 Feb; 256(2): 801-810.
- Wilson KM, Minneman KP. Regional variations in α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain. *J Neurochem* 1989; 43:1782-1786.
- Winternitz SR, Oparil S. Importance of the renal nerves in the pathogenesis of experimental hypertension. *Hypertension* 1982; 4(5 Pt2):1108-1114.
- Wo MA, Ruffolo JrRR. Heterogeneity of postjunctional α_1 -adrenoceptors in mammalian aortae: subclassification based on chlorethylclonidine, WB4101 and nifedipine. *J Vasc Res* 1992; 29:33-40.
- Wong SK, Ross EM. Chimeric muscarinic cholinergic: β -adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G-proteins. *J Biol Chem* 1994; 269:18986-18976.
- Wlodek ME, Westcott KT, Ho PW, Serruto A, Di Nicolantonio R, Farrugia W, Moseley JM. Reduced fetal, placental, and amniotic fluid PTHrP in the growth-restricted spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000 Jul; 279(1):R31-R38.
- Wright IK, Harling R, Kendall DA, Wilson VG. Examination of the role of inhibition of cyclic AMP in α_2 -adrenoceptors mediated contractions of the porcine isolated palmar lateral vein. *Br J Pharmacol* 1995; 114:157-165.
- Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982 Sep; 243(3): H365-H370.
- Wu CC, Bohr DF. Mechanisms of calcium relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1991 Nov; 261(5 Pt 2): H1411-H1416.
- Wu D, Katz A, Lee C, Simon MI. Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors in mediated by the alpha subunits of Gq family *J Biol Chem* 1992; 267:25789-25802.
- Xiao XH, Medgett IC, Rand MJ. The alpha 2-adrenoceptor agonists clonidine, TL99 and DPI enhance vasoconstrictor responses to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the rat tail artery preparation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987 Nov-Dec; 14(11-12):903-909.
- Xu D, Wang XA, Wang JP. [Calcitonin gene-related peptide in normotensive and spontaneously hypertensive rats]. *Chung Hua Hsin Hsueh Kuan Ping Tsa Chih* 1989 Jun; 17(3): 174-7, 190.
- Xue H, McCarron DA, Bukoski RD. 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ induced ⁴⁵Ca uptake in vascular myocytes cultured from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Life Sci* 1991; 49:651-659.

- Yablonsky F, Riffaud JP, Lacolle JY, Dausse JP. α_1 - and α_2 -Adrenoceptors in the smooth muscle of male and female rabbit urethra. *Eur J Pharmacol* 1986; 121:1-8.
- Yamada S, Yamamura HI, Roeske WR. Alterations in central and peripheral adrenergic receptors in deoxycorticosterone/salt hypertensive rats. *Life Sci* 1980 Dec 15; 27(24): 2405-2416.
- Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Signaling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal* 1998; 10(10):693-698.
- Yang M, Ruan J, Voller M, Schalken J, Michel MC. Differential regulation of human α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359(6):439-446.
- Yang-RH; Jin-HK; Chen-YF; Oparil-S; Wyss-JM. Dietary Ca^{2+} supplementation prevents the exaggerated responsiveness of anterior hypothalamic α_2 -adrenoceptors in NaCl-loaded spontaneously hypertensive rats. *J-Cardiovasc-Pharmacol*. 1989 Jan; 13(1): 162-7.
- Yang HT, Endoh M. Pharmacological evidence for α_{1D} -adrenoceptors in the rabbit ventricular myocardium. Analysis with BMY7378. *Br J pharmacol* 1997; 122:1541-1550.
- Yoshimoto R, Mitsui Saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 1998; 123(8):1645-1654.
- Yoshimura N, De Groat WC. Patch clamp analysis of afferent and efferent neurons that innervate the urinary bladder of the rat. *Soc Neurosci* 1992; Abstr 18, 126.
- Young EW, Morris CD, McCarron DA. Urinary calcium excretion in essential hypertension. *J Lab Clin Med* 1992 Oct; 120(4):624-632.
- Yu GS, Han C. Role of α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors in phenylephrine induced positive inotropic response in isolated rat left atrium, *J cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:745-752.
- Yu W, Hao JX, Xu XJ, Saydoff J, Haegerstrand A, Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z. Long-term alleviation of allodynia-like behaviors by intrathecal implantation of bovine chromaffin cells in rats with spinal cord injury. *Pain* 1998; 74(2-3)115-122.
- Yuasa S, Sumikura T, Yura T, Takahashi N, Shoji T, Uchida K, Fujioka H, Miki S, Matsuo H, Takamitsu Y. Effect of low dietary calcium intake on blood pressure and pressure natriuresis response in rats: a possible role of the renin-angiotensin system. *Blood Press* 1996 Mar; 5(2): 121-127.
- Zawada ET Jr; Brickman AS, Maxwell MH, Tuck M. Hypertension associated with hyperparathyroidism is not responsive to angiotensin blockade. *J Clin Endocrinol Metab* 1980 May; 50(5): 912-915.
- Zeng D, Harrison JK, D'Angelo DD, Barber CM, Tucker AL, Lu Z, Lynch KR. Molecular Characterization of a rat α_{2B} -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3102-3106.
- Zhong H, Minneman KP. α_1 -adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1999; 375(1-3):261-276.
- Zhu Z, Neusser M, Tepel M, Spieker C, Golinski P, Zidek W. Effect of Na,K-ATPase inhibition on cytosolic free calcium ions in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Hypertens* 1994 Sep; 12(9):1007-1112.
- Zicha J. Red cell ion transport abnormalities in experimental hypertension. *Fundam Clin Pharmacol* 1993; 7(3-4):129-141.
- Zilles K, Gross G, Schleicher A, Schildgen S, Bauer A, Bahro M, Schwendemann G, Zech K, Kolassa N. Regional and laminar distributions of α_1 -adrenoceptors and their subtypes in human and rats hippocampus. *Neuroscience* 1991; 40:307-320.
- Zozaya JL. Nutritional factors in high blood pressure. *J Hum Hypertens* 2000 Apr; 14 Suppl 1:S100-S104.

-Zschauer AOA, Sielczak MW, Smith DAS, Wanner A. Norepinephrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: role of α_1 - and α_1 -adrenoceptor activation. *J Appl Physiol* 1997; 82(6):1918-1925.