

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO DEL *N*-ACETIL DERIVADO
DE LA FENILEFRINA**

**Trabajo de Tesis Doctoral para
aspirar al Grado de Doctor en
Farmacia, que presenta la
Licenciada Elisa M^a Garofa Ruiz**





UNIVERSIDAD
DE
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

EL PROF. DR. D. JOSÉ JIMÉNEZ MARTÍN, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

CERTIFICA: Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado "*Estudio farmacológico del
N-acetil derivado de la fenilefrina*", ha sido realizado por la
Licenciada D^a Elisa M^a García Ruiz en los laboratorios de este
Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada
a diecisiete de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

Fdo: Dr. D. José Jiménez Martín



UNIVERSIDAD
DE
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

D. ANTONIO ZARZUELO ZURITA Y D. JUAN MANUEL DUARTE PÉREZ,
PROFESOR TITULAR Y AYUDANTE, RESPECTIVAMENTE, DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA, COMO DIRECTORES

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que lleva por título "*Estudio farmacológico del N-acetil derivado de la fenilefrina*", presentada por la Licenciada D^a Elisa M^a García Ruiz reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada,
a diecisiete de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

Fdo: Dr. D. A. Zarzuelo Zurita

Dr. D. J. M. Duarte Pérez

A mi madre y hermano

*Por la ciencia, la visión de Dios
puede comenzar aquí en el mundo.*

(Moisés ben Maimón "Maimónides")

En palabras de Álvarez Cienfuegos "*la gratitud no cuenta lo que da, porque siempre debe*". De ahí que sea muy difícil encerrar en palabras hasta que punto agradecemos a ciertas personas su colaboración, sin que seamos ingratos, no sólo con ellos, sino con otros, a los que por olvido, siempre involuntario, no mencionamos. Por ello quiero agradecer de antemano la colaboración de todos los integrantes del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Deseo agradecer de un modo especial a:

D. J. Jiménez Martín, Catedrático-Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, por sus sugerencias y apoyo durante la elaboración de esta Tesis.

D. A. Zarzuelo Zurita, Profesor Titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, por su labor de dirección, su apoyo y enseñanzas recibidas. Gracias también por su amistad, más apreciable si cabe, en los momentos en que flaquea el ánimo.

D. J. M. Duarte Pérez, Ayudante del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, no sólo por la dirección de este Trabajo de Tesis, sino por su trabajo, y por su constante e impagable ayuda, tanto durante la investigación, como en la redacción del mismo.

D. J. J. Gálvez Peralta, Ayudante del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, por sus sugerencias y su colaboración en todo momento.

Isa y Pilar, que al estar incluidas en el mismo proyecto de investigación, han vivido el día a día de esta Tesis. Gracias por su paciencia, su ayuda y su amistad.

Mercedes, Silvia, Inés y Leo, por su apoyo, y por compartir conmigo, algunos malos, y muchos buenos ratos.

Fermín y Roberto, por su colaboración a la hora de escribir este Trabajo.

el Departamento de Química Física de esta Facultad, por proporcionarnos el N-acetil derivado de la fenilefrina, fármaco estudiado en esta Tesis.

los Laboratorios Boehringer Ingelheim, por la financiación de este Trabajo de Tesis, así como por concederme una beca de investigación en colaboración con la Universidad de Granada, que me ha proporcionado ayuda económica durante el tiempo que ha durado el mismo.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL.

ACh	Acetilcolina
AD	Adrenalina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CEC	Cloroetilclonidina
CLO	Clonidina
Col.s.	Colaboradores
DAG	Diacilglicerol
DL	Dosis letal
DPA	Duración del potencial de acción cardiaco
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético
E_{máx.}	Efecto máximo
FE	Fenilefrina
FRDE	Factor relajante dependiente del endotelio
Ins	Inositol
IP₂	Inositol difosfato
IP₃	Inositol trifosfato
ISO	Isoprenalina o isoproterenol
K_B	Constante de disociación
KS	Solución Krebs-Henseleit
lpm	Latidos por minuto
M	Molar
n,N	Número de animales
NA	Noradrenalina
NAF	N-acetilfenilefrina
NIF	Nifedipina

pág	Página(s)
P_o	Proteína G
S	Desviación estándar
SEM	Su error medio
SNC	Sistema Nervioso Central
v.s.	versus

ÍNDICE

OBJETO	1
PARTE BIBLIOGRÁFICA	3
I. INTRODUCCIÓN	3
II. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS ALFA	7
II.1. Clasificación α_1/α_2	7
II.1.1. Clasificación anatómica	7
II.1.2. Clasificación funcional	8
II.1.3. Clasificación farmacológica	9
II.2. Tipos de receptores adrenérgicos α_1	11
II.3. Tipos de receptores adrenérgicos α_2	15
III. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES ALFA	19
III.1. Movimientos de calcio	19
III.2. Metabolismo de los fosfolípidos de membrana	22
III.3. Inhibición de la adenilciclasa	25
III.4. Intercambio sodio/hidrógeno	26
IV. EFECTOS FARMACOLÓGICOS	28
IV.1. A nivel de SNC	29

IV.2. A nivel de Sistema Cardiovascular	34
VI.2.1. Corazón	34
VI.2.2. Vasos	36
IV.3. A nivel de Aparato Digestivo	36
IV.4. A nivel de Aparato Respiratorio	37
IV.5. A nivel de Aparato Genitourinario	38
IV.6. A nivel de metabolismo	39
IV.7. A otros niveles	40
PARTE EXPERIMENTAL	41
MATERIAL Y MÉTODOS	41
0. INTRODUCCIÓN	41
0.1. Fármacos utilizados	41
0.2. Animales utilizados	42
0.3. Estadística	43
I. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS	44
I.1. Cálculo de la toxicidad aguda	44
I.1.1. Descripción de la técnica y desarrollo de la experiencia	44
I.1.2. Expresión de resultados	45
II. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS	46
II.1. Efectos sobre Sistema Cardiovascular	46

II.1.1. Determinación de la presión arterial	46
II.1.1.a. Método cruento	46
II.1.1.b. Método incruento	47
II.1.2. Efectos sobre músculo liso vascular:	
aorta aislada de rata	48
II.1.2.a. Descripción de la técnica	48
II.1.2.b. Desarrollo de la experiencia	49
II.1.2.c. Expresión de resultados	51
II.1.3. Efectos sobre el músculo cardiaco:	
aurícula aislada de cobaya	51
II.1.3.a. Descripción de la técnica	51
II.1.3.b. Desarrollo de la experiencia	52
II.1.3.c. Expresión de resultados	53
II.2. Efectos a otros niveles	53
II.2.1. Efectos sobre el SNC	53
II.2.1.a. Descripción de las técnicas	53
<i>Test de la curiosidad</i>	53
<i>Determinación de la actividad motora</i>	54
<i>Modificación del tiempo de sueño barbitúrico</i>	54
II.2.1.b. Desarrollo de las experiencias	55
II.2.2. Efectos sobre el músculo liso traqueal:	
tráquea aislada de cobaya	55
II.2.2.a. Descripción de la técnica	55
II.2.2.b. Desarrollo de la experiencia	56
II.2.2.c. Expresión de resultados	56
II.2.3. Efectos sobre el conducto deferente aislado de rata	57
II.2.3.a. Descripción de la técnica	57
II.2.3.b. Desarrollo de la experiencia	58

II.2.3.c. Expresión de resultados	58
RESULTADOS	59
I. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS	59
I.1. Cálculo de la toxicidad aguda	59
II. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS	61
II.1. Efectos sobre Sistema Cardiovascular	61
II.1.1. Determinación de la presión arterial	61
II.1.1.a. Método cruento	61
II.1.1.b. Método incruento	63
II.1.2. Efectos sobre músculo liso vascular:	
aorta aislada de rata	67
II.1.3. Efectos sobre músculo cardiaco:	
aurícula aislada de cobaya	75
II.1.3.a. Aurícula derecha	75
II.1.3.b. Aurícula izquierda	75
II.2. Efectos a otros niveles	78
II.2.1. Efectos sobre SNC	78
II.2.1.a. Test de la curiosidad	78
II.2.1.b. Determinación de la actividad motora	81
II.2.1.c. Modificación del tiempo de sueño barbitúrico	83
II.2.2. Efectos sobre músculo liso traqueal:	
tráquea aislada de cobaya	85
II.2.3. Efectos sobre conducto deferente aislado de cobaya	88

DISCUSIÓN	90
I. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	90
II. EFECTOS A NIVEL CARDIOVASCULAR	91
II.1. Presión arterial	91
II.2. Sobre músculo liso vascular	92
II.3. Sobre el músculo cardiaco	94
III. EFECTOS A OTROS NIVELES	95
III.1. Sobre SNC	95
III.2. Sobre músculo liso traqueal	96
III.3. Sobre conducto deferente	97
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	101

OBJETO

Es una preocupación cada vez mayor, de las sociedades desarrolladas, la investigación dirigida a mejorar la salud, siendo las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular unas de las que tienen más amplia repercusión. Por ello, los fármacos destinados a combatir las han adquirido una gran importancia en la actualidad. Uno de los grupos farmacológicos utilizados son las aminas simpaticomiméticas, entre las que destaca la fenilefrina (FE) por sus propiedades vasoconstrictoras.

Dado el creciente interés de este campo de investigación, la industria Boehringer Ingelheim y los Departamentos de Química Física y Farmacología de la Universidad de Granada han desarrollado un proyecto conjunto titulado "*Estudios fisicoquímicos y farmacológicos de aminas simpaticomiméticas de interés terapéutico*", en cuyo marco se sitúan los trabajos de esta Tesis Doctoral. Gracias a esta colaboración, los laboratorios del Departamento de Química Física han sintetizado un derivado N-acetilado de la fenilefrina (NAF), cuyo perfil farmacológico y toxicológico es poco conocido.

El proyecto de la presente Tesis Doctoral es ampliar el conocimiento de los efectos de la NAF, fundamentalmente a nivel cardiovascular, basándonos en la actividad de la fenilefrina de estimular los receptores α .

Para llevar a cabo este objeto proponemos el siguiente Plan de Trabajo.

PLAN DE TRABAJO

I. *Parte bibliográfica.* En este apartado haremos una revisión acerca de los conocimientos actuales sobre el receptor α . Esta revisión es necesaria para poder situar nuestros resultados con la NAF dentro de dichos conocimientos.

II. *Parte experimental.* En este capítulo pretendemos estudiar el perfil farmacológico de la NAF y compararlo con el de la FE, fármaco utilizado como patrón. Este perfil expuesto esquemáticamente es el siguiente:

II.1. Estudios de toxicidad aguda

II.2. Estudios a nivel del sistema cardiovascular. Estos ensayos constituyen la parte fundamental de esta Tesis, ya que es la aplicación principal de las aminas simpaticomiméticas.

II.3. Estudios a otros niveles.

II.3.1. A nivel del SNC

II.3.2. A nivel de tráquea aislada de cobaya

II.3.3. A nivel de conducto deferente aislado de rata

PARTE
BIBLIOGRÁFICA

Como se ha comentado al exponer el objeto de este trabajo de Tesis Doctoral, se pretende estudiar las modificaciones en la actividad farmacológica de la fenilefrina (FE) cuando se acetila su grupo amino (N-acetilfenilefrina, NAF). La FE produce numerosos efectos al interactuar con el organismo animal, muchos de los cuales son consecuencia directa de la activación de los receptores adrenérgicos α (Minneman, 1988). Parece lógico, por tanto, realizar una aproximación a los conocimientos existentes en la actualidad sobre este tipo de estructuras celulares; en particular, a su clasificación, a la existencia de distintos subtipos, a los mecanismos de transducción de la señal de activación, para finalizar recogiendo brevemente los efectos más evidentes que se observan tras su estimulación. La alteración de la estructura química de la FE puede originar cambios cuali y cuantitativos en los efectos observados, que únicamente pueden ser interpretados de forma correcta mediante el perfecto conocimiento de este receptor.

EL RECEPTOR ALFA

I. INTRODUCCIÓN

Los receptores son estructuras macromoleculares de naturaleza proteica, en ocasiones unidos a radicales lipídicos o hidrocarbonados, localizados en la membrana extracelular de las células, en el citoplasma o incluso en el núcleo celular; capaces de formar selectivamente enlaces con las moléculas farmacológicas (Flórez, 1987a).

Las investigaciones encaminadas a poner de manifiesto su estructura, localización anatómica y acciones farmacológicas de las que son responsables

aportan nuevos datos día a día. Un claro ejemplo de esta evolución lo constituye los llamados **receptores adrenérgicos**, estructuras localizadas en la superficie celular de diferentes órganos diana, con los que interactúan las catecolaminas endógenas para originar sus efectos fisiológicos.

Los primeras evidencias que establecen la existencia de una heterogeneidad de receptores adrenérgicos se obtienen al observar las diferencias en la actividad farmacológica que, sobre diversos órganos, originan las aminas naturales, adrenalina (AD), y noradrenalina (NA), y la sintética isoprenalina (ISO) (Alquist, 1948). Con estos datos se realiza la primera clasificación de receptores adrenérgicos atendiendo a criterios farmacológicos, denominándose **receptores α** a aquellos que son estimulados por las tres catecolaminas en el orden de potencia: AD > NA > ISO y **receptores β** los que se estimulan en el orden de potencia ISO > AD > NA.

En general los receptores α son responsables de las respuestas de tipo excitatorio: vasoconstricción o contracción de la musculatura lisa como la del conducto deferente; mientras los receptores β median respuestas de tipo inhibitorio: relajación de la musculatura lisa del tracto respiratorio o vasodilatación (Wenzel y Su, 1966; Jenkinson y Morton, 1967).

La confirmación de la existencia de estos dos tipos de receptores se consigue con la utilización de fármacos antagonistas que bloquean selectivamente las acciones α (ergotamina, fenoxibenzamina) o las β (dicloroisiprenalina, propranolol) (Powell y Slater, 1958; Moran y Perkins, 1958). Por otra parte, mediante técnicas de fijación de ligandos radiactivos específicos, de naturaleza tanto agonista como antagonista: [^3H]-dihidroalprenolol, [^{125}I]-hidroxibencilpindolol, [^3H]-

haloperidol,...(Mukherjee y cols., 1976; Bylund y Snyder, 1976; Randall y cols., 1977; Brown y cols., 1976; Creese y cols., 1975) se demuestra no sólo la existencia real de estos receptores α y β , sino también la certeza de que no forman una población homogénea, sino que dentro de ellos existen distintos subtipos.

Desde la clasificación de las respuestas adrenérgicas en α y β , numerosos estudios sobre la farmacología de sus receptores han originado la división de cada una de las familias de estos en diversos tipos. Así, las respuestas β -adrenérgicas se dividen en dos clases, llamadas β_1 y β_2 , en base a la potencia relativa del ISO, AD y NA (Lands y cols, 1967). Los receptores adrenérgicos β_1 presentan aproximadamente igual afinidad por AD y NA, mientras que los β_2 reconocen una mayor afinidad por AD que por NA.

Las respuestas α -adrenérgicas también se dividen, en un principio, en dos tipos, denominadas α_1 y α_2 , en función de la potencia relativa de agonistas y antagonistas selectivos (Greenberg y cols., 1976; Ruffolo y cols., 1976; Langer, 1974; Berthelsen y Pettinger, 1977; Bentley y cols., 1977). Así por ejemplo, los receptores sobre los que actúa la FE como agonista más potente que la clonidina (CLO) y el prazosín como antagonista de potencia superior a la yohimbina se les denominan α_1 , y en el caso de que el orden de potencia se invierta se trata de receptores del subtipo α_2 . Recientemente se conocen datos experimentales que apoyan la idea de heterogeneidad dentro de cada uno de los tipos de receptores adrenérgicos α (Minneman, 1988; Bylund, 1985, 1988).

También es posible distinguir las respuestas adrenérgicas de los distintos tipos de receptores en base a los mecanismos de transducción de su señal de activación. La conexión entre la activación de los mismos y su respuesta

funcional final consiste en una serie de acontecimientos complejos que sólo ahora comienzan a ser conocidos en términos moleculares. La activación de los distintos tipos de receptores puede iniciar una variedad de cambios en el funcionamiento de la membrana y acontecimientos bioquímicos intracelulares entre los que se incluyen la regulación de los canales iónicos de la membrana plasmática, activación de mecanismos de intercambio iónico a través de la misma y estimulación e inhibición de los sistemas enzimáticos asociados a ella. Todos ellos conducen a cambios en la concentración intracelular de algunos mediadores, cada uno de los cuales es capaz de producir diferentes cambios en la función celular. En la actualidad se conoce que proteínas reguladoras unidas a nucleótidos de guanina (proteínas G) desempeñan un papel central en la transducción de la señal de activación del receptor y la iniciación del primer paso de la vía de transducción (Robishaw y Foster, 1989; Schultz y cols., 1990).

Los receptores adrenérgicos (α y β) se incluyen dentro de una gran familia de receptores de membrana que transmiten información al interior de las células acoplados a proteínas G (Dohlman y cols, 1987; Strader y cols., 1989; Lefkowitz y Caron, 1988; Gilman, 1987); sin embargo los mecanismos de la señal de ambos tipos son distintos. Así, mientras que los receptores adrenérgicos β , con independencia del subtipo, se acoplan con la activación de la adenilciclase lo que origina un aumento de los niveles del segundo mensajero AMPc (Lefkowitz y cols., 1983; Emorine y cols., 1989), los receptores α activan distintas vías dependiendo del subtipo considerado. La unión de agonistas a los receptores adrenérgicos α_1 conduce a la activación de la fosfolipasa C y a la alteración de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Minneman, 1988); mientras, los receptores adrenérgicos α_2 parecen estar acoplados a la adenilciclase pero de forma inhibitoria (Jakobs y cols., 1976).

El aislamiento de las proteínas puras del receptor adrenérgico α (Lomasney y cols., 1986) y la subsiguiente clonación y expresión en distintos receptores (Cotecchia y cols., 1988), confirman la presencia de múltiples subtipos de receptores adrenérgicos, tanto α_1 como α_2 , así como revelan la conformación molecular del receptor. Si bien, los estudios funcionales y moleculares muestran la presencia de múltiples subtipos de receptores adrenérgicos α , aún no se ha establecido la exacta correspondencia entre el receptor funcional y la expresión de las proteínas que lo forman.

II. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS ALFA

II.1. CLASIFICACIÓN α_1/α_2

II.1.1. CLASIFICACIÓN ANATÓMICA

Durante muchos años se conocía que los antagonistas de los receptores adrenérgicos α incrementaban la liberación de NA producida por estimulación nerviosa simpática. Brown y Gillespie (1957) sugieren que este efecto se debe al bloqueo de los receptores postsinápticos α , que al prevenir la interacción de la NA liberada con los receptores de la célula efectora conducen a un aumento de la liberación de NA. En contraste con esta hipótesis, Thoenen y cols. (1964) proponen que este efecto se debe a la inhibición de la captación neuronal de la NA liberada. Posteriormente, Starke y cols. (1971a,b) y Langer y cols. (1971) postulan que este efecto de los antagonistas adrenérgicos α es un fenómeno presináptico mediado por bloqueo de receptores α . Esta hipótesis se confirma ya que los agonistas α pueden inhibir la liberación neuronal de NA por un mecanismo relacionado con los

receptores adrenérgicos α y que la NA liberada puede inhibir su propia liberación por un mecanismo feedback negativo (Starke, 1972a,b).

Posteriores estudios demuestran que ciertos agonistas, como la CLO, y ciertos antagonistas, como fenoxibenzamina, pueden ser utilizados para discriminar entre receptores adrenérgicos pre- y postsinápticos (Starke y cols., 1974, 1975; Dubocovich y Langer, 1974). Esto prueba que, además de tener localizaciones anatómicas distintas, son también entidades farmacológicamente diferentes.

Como resultado de estas investigaciones Langer (1974) propone que los receptores adrenérgicos de localización postsináptica que median la respuesta del órgano efector se denominen α_1 y que los localizados presinápticamente, que regulan la liberación del neurotransmisor, son los α_2 .

II.1.2. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL

Frecuentemente la clasificación anatómica de los receptores adrenérgicos α (postsinápticos= α_1 ; presinápticos= α_2) es cierta. Sin embargo, también se conoce que la localización anatómica sola, no puede ser utilizada para clasificar los receptores adrenérgicos α , como prueba el hecho de que determinados efectos producidos por agonistas con mayor selectividad por los receptores α_2 son postsinápticos, tales como la inhibición de la dispersión de los gránulos de melanina inducida por la hormona estimulante de los melanocitos en la piel de la rana (Pettinger, 1977) y la inhibición de la glucólisis y lipólisis inducidas por ISO en adipocitos epididimales aislados de hámster (Schimmel, 1976).

Berthelsen y Pettinger (1977) sugieren una clasificación funcional de los receptores α basada, no en su localización, sino en el tipo de función mediada por el subtipo de receptor. Así, los receptores α_2 son los que originan respuestas inhibitorias mientras que los α_1 tienen carácter excitador.

Sin embargo, esta clasificación funcional (inhibidores= α_2 ; excitadores= α_1) no puede aplicarse en todos los casos. La utilización de nuevos antagonistas muy selectivos por los receptores α_1 , como el prazosín, permite a Drew y Whiting (1979) demostrar que la respuesta vasoconstrictora de NA en rata y gato se inhibe no sólo por prazosín, sino también por un antagonista selectivo de los receptores α_2 , la yohimbina, y por tanto, que la respuesta excitadora postsináptica puede estar mediada tanto por receptores α_2 como por α_1 .

Por consiguiente, ni la localización anatómica ni la actividad funcional pueden ser utilizadas para clasificar los receptores adrenérgicos α . El sistema de clasificación de estos receptores aceptado universalmente en la actualidad es el farmacológico, basado únicamente en la afinidad relativa de agonistas y antagonistas selectivos.

II.1.3. CLASIFICACIÓN FARMACOLÓGICA

Esta clasificación se basa en la potencia relativa de series de agonistas y antagonistas. Por ejemplo, un receptor adrenérgico que se activa por metoxamina, cirazolina o FE y se bloquea de forma competitiva por pequeñas concentraciones de prazosín, WB 4101 y corinantina se clasifica como un receptor α_1 . Por otra parte, respuestas a α -metilnoradrenalina, UK 14,304, BHT 920 y BHT 933 que se

antagonizan competitivamente por pequeñas concentraciones de yohimbina, rauwolscina o idazoxán, se producen vía receptores α_2 . El neurotransmisor simpático natural, NA, es un agonista relativamente no selectivo y la hormona adrenal, AD, presenta sólo pequeña selectividad por los receptores α_2 .

En la **tabla 1** se recoge la selectividad sobre los subtipos de receptor de varios agonistas y antagonistas de los receptores α .

Tabla 1

Selectivo por receptores α_1	No selectivo	Selectivo por receptores α_2
Agonistas		
Fenilefrina	Noradrenalina	Clonidina
Metoxamina	Adrenalina	α -metilnoradrenalina
Cirazolina		B HT 933
Amidefrina		B HT 920
Sgd 101/75		UK 14,304
Antagonistas		
Prazosín	Fentolamina	Rauwolscina
WB 4101	Tolazolina	Yohimbina
Corinantina		Idazoxán

II.2. TIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1

Los receptores adrenérgicos α_1 pueden ser farmacológicamente subdivididos en distintos subtipos. Esta subdivisión se basa en los siguientes criterios:

- Diferente sensibilidad de las respuestas mediadas por receptores α_1 al bloqueo con prazosín y otros antagonistas α_1 .
- Diferente requerimiento de Ca^{2+} extracelular para la respuesta inducida por receptores α_1 .

En general, cuando se comparan la afinidad antagonista de un fármaco en diferentes ensayos de receptores α_1 suele aparecer una excelente correlación entre ellas (Hiegle y cols., 1982; Timmermans y cols., 1981). Sin embargo, existen algunos datos que sugieren diferencias entre los receptores α_1 en función de la especie y el tipo de tejido animal (Ruffolo y Waddell, 1982; Ruffolo y cols., 1984a; Ruffolo y Zeid, 1985). Así por ejemplo, el prazosín, potente antagonista selectivo de estos receptores, si se examina su constante de disociación frente a una serie de respuestas mediadas por receptores α_1 se observan modificaciones de su afinidad de aproximadamente 100 veces (Agrawal y cols., 1984; Medgett y Langer, 1984; Drew, 1985; Flavanhan y Vanhoutte, 1986). Medgett y Langer (1984) sugieren que el amplio rango en la afinidad de este fármaco es el resultado de su capacidad para diferenciar entre dos subtipos de receptores α_1 , unos inervados directamente y con alta afinidad por el prazosín ($K_B < 0.4 \text{ nM}$), y otros localizados lejos de las terminales nerviosas y con menor afinidad por el prazosín ($K_B > 1.6 \text{ nM}$).

La subdivisión de receptores α_1 también se puede realizar en función de la capacidad de varios antagonistas para producir un desplazamiento bifásico del [^3H]-prazosín unido a membranas de diversos tejidos centrales o periféricos. Así, indoramina y dihidroergocriptina producen un desplazamiento monofásico en membranas de la corteza cerebral de rata, mientras que fentolamina y WB 4101 producen un desplazamiento en dos componentes, cada uno de los cuales representa aproximadamente el 50% de total de uniones. Por ello, se sugiere que estos últimos antagonistas α permiten discriminar entre dos subtipos de receptores α_1 en este tejido (Morrow y cols., 1985). Teniendo en cuenta estos resultados se considera un subtipo de receptor α_1 con una afinidad subnanomolar por WB 4101, llamado α_{1A} , y otro de menor afinidad, α_{1B} (Morrow y Creese, 1986). Recientes estudios demuestran que el 5-metilurapidilo presenta mayor capacidad para diferenciar estos subtipos de receptores que el WB 4101 (Gross y cols., 1988).

Minneman y cols. (1988) reiteran la existencia de dos subtipos de receptores α_1 (α_{1A} y α_{1B}) en base a estudios funcionales, demostrando que los dos subtipos se relacionan con dos diferentes procesos intracelulares.

El análogo alquilado de la CLO, cloroetilclonidina (CEC), capaz de inactivar sólo el 50% de los receptores α_1 en cortex cerebral de rata y de no bloquear ningún receptor en hipocampo, a pesar de que los receptores de ambas localizaciones son sensibles a la inactivación (alquilación) con fenoxibenzamina, también se utiliza para distinguir subtipos de receptores α_1 (Johnson y Minneman, 1987). Además la CEC puede inactivar casi todos los receptores α_1 en hígado y bazo de rata, pero pocos de los existentes en conducto deferente (Han y cols., 1987a). El subtipo de receptores insensibles al CEC se denomina α_{1B} , y el subtipo sensible al mismo α_{1A} . Además, otros estudios demuestran que el WB 4101 tiene mayor

afinidad por los sitios insensibles al CEC que por los sensibles, lo que puede interpretarse como que el CEC es selectivo por los receptores designados previamente por Morrow y colaboradores como α_{1B} (Han y cols., 1987b).

La respuesta insensible al CEC para la NA en conducto deferente de rata, se inhibe por antagonistas de los canales de calcio, o por quelación del calcio extracelular con ácido etilenglicol bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), mientras que estas dos actuaciones farmacológicas no afectan a la respuesta, en bazo de rata, sensible a CEC. Estos hechos permiten deducir que los dos subtipos de receptores se relacionan con procesos diferentes de transducción de la señal de activación. Los receptores α_{1a} se relacionan con entrada de calcio extracelular, y los α_{1b} con liberación de calcio intracelular (Han y cols., 1987b).

Estudios recientes intentan identificar ambas terminologías; en este sentido se demuestra que los receptores α_{1b} (sensibles a CEC) y los α_{1B} (insensible a WB 4101), se relacionan casi exclusivamente con la generación intracelular de inositol fosfatos, y la consiguiente liberación de calcio intracelular (Minneman y cols., 1988). Sin embargo, la total identificación de las dos terminologías no puede hacerse hasta que no exista total confirmación.

Actualmente se sugiere la existencia de un subtipo de receptor α_1 diferente a α_{1a} y α_{1b} ; así Motley y cols. (1990) y Oriowo y cols. (1990) encuentran que en aorta de rata existe un único tipo de receptor α_1 que media la respuesta de diferentes agonistas, a pesar de su variada relación con la fuente de calcio (intracelular o extracelular). En esta preparación un agonista parcial, (-)-dobutamina, es muy sensible a la inhibición por nifedipina (Oriowo y cols., 1990) y es únicamente un débil agonista para inducir el metabolismo de inositol fosfato (Motley

y cols., 1990), lo que indica una relativa selectividad de interacción con receptores α_{1a} . La respuesta a NA, sin embargo, que teóricamente interacciona con ambos subtipos de receptores α_1 (Minneman y cols., 1988), es insensible a inhibición con nifedipina (Oriowo y cols., 1990) y produce un gran aumento en el metabolismo de inositol fosfato (Motley y cols., 1990). Tanto NA (no selectivo) como dobutamina (selectivo α_{1a}) protegen de la alquilación con fenoxibenzamina (que interacciona selectivamente con receptores α_{1b}). Esto confirma la teoría de la interacción de ambos agonistas con un único receptor, que puede activar diferentes señales de transducción, y que no puede ser clasificado como α_{1a} ó α_{1b} .

La existencia de este subtipo de receptor α_1 , también se ha puesto de manifiesto en arteria caudal de rata (Sulpizio e Hieble, 1991). El componente inicial (fásico) de la respuesta contractora de la arteria caudal de rata depende exclusivamente de la liberación de calcio intracelular, mientras la respuesta tónica secundaria depende sólo de la entrada de calcio extracelular. Relacionando esto con la hipótesis de Minneman (1988), la respuesta fásica puede estar mediada por receptores α_{1b} y es selectivamente antagonizada por CEC; en tanto que la respuesta tónica, puede estar mediada por receptores α_{1a} , y es selectivamente antagonizada por WB 4101, (+)-niguldipina y 5-metilurapidilo. Sin embargo, ambas fases de la contracción son abolidas por pequeñas concentraciones de estos tres últimos compuestos (selectivos α_{1a}) y por concentraciones de CEC superiores a 100 μ M (que inactivan selectivamente los α_{1b}). Por tanto, puede ocurrir que en este tejido la adición NA exógena active un único receptor que sea sensible a antagonistas, tanto α_{1a} como α_{1b} .

De todo lo expuesto anteriormente se concluye que aunque existen evidencias para hablar de la heterogeneidad del receptor α_1 , actualmente no se

conocen mecanismos consistentes para explicar su subdivisión. Sin embargo, los estudios de clonación y expresión del receptor apoyan la existencia de estos subtipos y el que algunos de ellos interactúan exclusivamente con un proceso de transducción de la señal (o proteína G) y otros con diversos procesos de transducción de la señal.

II.3. TIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_2

Los receptores α_2 tampoco representan una población homogénea. Estudios farmacológicos en los que se determinan afinidades por la yohimbina, antagonista de estos receptores, señalan la existencia de grupos diferentes de receptores α_2 presentes en especies distintas (Drew, 1985), aunque también existen ejemplos de diversidad entre tejidos dentro de una misma especie (Skarby y cols., 1983; Hieble y Woodward, 1984).

Experiencias realizadas con varios antagonistas apoyan la idea de esta diferencia entre especies: los receptores α_2 de conducto deferente de rata son distintos a los de conducto deferente de conejo (Waterfall y cols., 1985); o los de cortex cerebral y plaquetas humanos, similares entre si y a su vez, distintos a los de cortex cerebral de rata (Cheung y cols., 1982). En el caso de los receptores α_2 humanos, la yohimbina posee alta afinidad por ellos y baja el prazosín, mientras en los de rata, es al contrario (Cheung y cols., 1982). También los receptores α_2 de pulmón de ratas neonatas poseen baja afinidad por yohimbina y alta por prazosín (Latifpour y cols., 1982).

Los estudios de *binding* ratifican las diferencias entre especies (Bylund, 1985; Petrash y Bylund, 1986). Así ocurre al analizar la capacidad del

prazosín por inhibir la unión de [³H]-yohimbina en diferentes regiones de cerebro humano y de rata, encontrándose zonas de heterogeneidad; en unos lugares la inhibición se caracteriza por la competición del prazosín por un solo sitio con baja afinidad, y en otros se establece por dos lugares, uno con baja afinidad, e igual a la observada en plaquetas humanas, y otro con alta afinidad y similar a la que presenta en pulmón de ratas neonatas. Estas diferencias regionales en la capacidad del prazosín para identificar dos lugares de unión del receptor α_2 , no son las mismas en cerebro de rata y en el humano; en el cortex de rata se demuestra la existencia de dos lugares con similar densidad, mientras que hay sólo un lugar en cortex humano.

Teniendo en cuenta estos resultados, Bylund propone una subclasificación de receptores α_2 en función de la potencia relativa del prazosín: el receptor con baja afinidad, tipificado como receptor α_2 de plaquetas humanas, se denominó α_{2A} , y al de mayor afinidad, tipificado por el receptor α_2 de pulmón de ratas neonatas, α_{2B} .

Trabajos recientes confirman esta subdivisión e identifican diversos tejidos y líneas celulares con un solo subtipo. Además, se han encontrado diferentes ligandos que presentan selectividad por uno u otro subtipo: benoxatián, oximetazolina y WB 4110 por α_{2A} ; clorpromacina, imiloxán y prazosín por α_{2B} (Michel y cols., 1990).

La existencia de estos subtipos de receptores α_2 se ha utilizado para intentar diferenciar entre receptores α_2 pre- y postsinápticos. Hieble y cols. (1986) encuentran una buena correlación entre la afinidad de una serie de antagonistas de receptores presinápticos en aurícula de cobaya y de receptores postsinápticos en vena safena de perro, lo que sugiere que hay homogeneidad entre receptores α_2

pre/postsinápticos. Esta correlación se ha encontrado también para miembros de varias clases químicas: alcaloides tipo yohimbina (yohimbina y rauwolscina), imidazolinas (fentolamina), 3-benzazepinas (SK&F 86466), benzodioxanos (piperoxán) y tetrahidroisoquinoleínas (SK&F 72223).

En contraste con estos hallazgos, otros grupos de trabajo proponen que los receptores α_2 presinápticos y postsinápticos son diferentes: ciertas imidazolinas 2,5-disustituidas son agonistas selectivos para los receptores α_2 presinápticos (De Jonge y cols., 1981) mientras que el SK&F 104078 es un antagonista selectivo de receptores postsinápticos α_2 (Hieble y cols., 1988).

Sin embargo, los datos obtenidos *in vivo* sugieren que el modelo de localización anatómica, al igual que no puede ser utilizado para clasificar receptores α (α_1 y α_2), tampoco debe emplearse para subclasificar los receptores α_2 . Así, aunque el SK&F 104078 antagoniza la respuesta presora mediada por receptores α_2 postsinápticos en ratas desmeduladas, el grado de antagonismo, comparado con el de yohimbina y rauwolscina, se limita a desplazar entre 3-4 veces como máximo las curvas dosis-respuesta del agonista (Hieble y cols., 1988). De ahí que pueda existir en los receptores α_2 postsinápticos un componente resistente al SK&F 104078 y, por tanto, una heterogeneidad de este tipo de receptor a nivel postsináptico.

Este mismo compuesto se utiliza también para poner de manifiesto diferencias a nivel presináptico; una dosis que inhibe significativamente la respuesta presora mediada por receptores α_2 postsinápticos vasculares en ratas desmeduladas, no tiene efecto en la inhibición de la taquicardia neurogénica, mediada por receptores α_2 presinápticos, que produce el agonista BHT 933; sin embargo, esta misma dosis sí deprime el efecto inhibitor de la taquicardia neurogénica producida

por otro agonista, xilacina (Akers y cols., 1989). Esto hace pensar en la existencia de diferentes receptores α_2 presinápticos, uno(s) sensible a inhibición con SK&F 104078, y otro insensible.

Para reafirmar esta hipótesis, se observa como en conducto deferente de rata la rauwolscina tiene igual potencia para inhibir los receptores α_2 presinápticos que median la inhibición de la liberación de neurotransmisor, cuando se estimulan por distintos agonistas, mientras que el SK&F sólo inhibe la actividad agonista de la CLO y el M 7 sobre estos receptores (Ruffolo y cols., 1991a).

Otro antagonista de receptores α , SK&F 104856, posee propiedades farmacológicas semejantes al SK&F 104078 (Hieble y cols., 1991) y también se utiliza para evidenciar diferentes poblaciones de receptores α_2 tanto localizadas pre- como postsinápticamente. No obstante, aún no se ha podido establecer relación entre los subtipos α_{2A} y α_{2B} y su situación anatómica.

Un problema adicional para el estudio de los receptores α_2 -presinápticos es la dificultad para el uso de radioligandos, que estriba en la baja densidad de estos receptores en terminales de neuronas simpáticas, de ahí que se sugiere el uso de glándula pineal bovina para la investigación de estos receptores (Bylund e Iversen, 1990).

Recientemente se ha propuesto la existencia de un tercer subtipo, α_{2C} identificado en células OK y en líneas celulares derivadas de riñón de zarigüeya. Se caracteriza por su semejanza con receptores α_{2B} (alta afinidad por prazosín), pero la relación de afinidad de prazosín y yohimbina es intermedia entre α_{2A} y α_{2B} (Murphy y Bylund, 1988). Estos receptores aún no se han identificado en tejidos humanos.

Mediante estudios con moléculas tipo imidazolina (idazoxán, CLO y p-aminoclonidina) marcadas radiactivamente se ha puesto de manifiesto la presencia de otro lugar de fijación distinto a los anteriores (Brown y cols., 1990). Además, como los radioligandos unidos a este nuevo lugar no son desplazados por ligandos fisiológicos de receptores α , NA y AD, es más correcto considerarlo como lugar no adrenérgico más que como subtipo α_2 ; aunque existen evidencias de que este lugar puede actuar como receptor farmacológico, mediando, al menos en parte, la acción antihipertensiva de CLO y otras imidazolininas (Tibirica y cols., 1991).

III. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES ALFA

Los procesos fundamentalmente implicados en la transducción de la señal de estos receptores son los siguientes:

- Movimientos de calcio
- Metabolismo de los fosfolípidos de membrana
- Inhibición de la adenilciclasa
- Intercambio sodio/hidrógeno

III.1. MOVIMIENTOS DE CALCIO

La mayoría de los estudios realizados para demostrar la implicación de los movimientos de Ca^{2+} , tras activación de los receptores α , se han realizado en músculo liso vascular. Incluso antes de la demostración de la coexistencia de receptores α_1 y α_2 a este nivel, se conocía que los iones Ca^{2+} estaban implicados en

la vasoconstricción producida por sus agonistas (Casteels, 1978; Van Meel y cols., 1981). La activación de los receptores α_1 se acopla con la entrada de calcio extracelular y la liberación de calcio de depósitos intracelulares; aunque esta hipótesis se ha cuestionado en los últimos años. Así, la respuesta presora *in vivo* mediada por receptores α_1 vasculares es resistente a la inhibición por antagonistas de los canales de calcio (Cavero y cols., 1983), lo que sugiere que la vasoconstricción producida por estos agonistas no depende de la entrada de calcio extracelular. Sin embargo, no todos los agonistas selectivos de estos receptores (St 586, Sgd 101/75 y dobutamina) son resistentes a este bloqueo (Ruffolo y cols., 1984b); por tanto, parece que algunos estimulantes α_1 producen vasoconstricción por entrada de calcio extracelular y otros no.

Los estudios de flujo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en aorta de conejo muestran que la activación de los receptores α_1 produce entrada de calcio extracelular (Deth y Lynch, 1981; Cauvin y cols., 1982; Awad y cols., 1983). Incluso los agonistas α_1 relativamente insensibles a la inhibición por antagonistas de calcio producen también entrada de calcio extracelular (Chiu y cols., 1986). Por otra parte, los estudios de salida de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ demuestran que los agonistas de los receptores α_1 también producen la liberación de calcio de sus depósitos intracelulares.

La contracción por estimulación α_1 tiene dos componentes, uno fásico y otro tónico, por utilizar diferentes fuentes de calcio. Leijten y cols. (1985) proponen que durante la activación de estos receptores, el calcio se libera de un pequeño depósito intracelular situado en la superficie interna de la membrana plasmática; éste no activa directamente la contracción del músculo liso, pero desencadena la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático. Simultáneamente, el unido a la superficie externa de la membrana plasmática se libera y entra en la

célula a través de canales de calcio receptor-dependientes. Estos dos procesos, liberación de calcio intracelular y entrada de calcio extracelular, son responsables de los componentes fásico y tónico, respectivamente, de la contracción. No obstante, la contribución relativa a la vasoconstricción del calcio extra o intracelular varía con las especies y con la localización anatómica (Cauvin y cols., 1984).

La vasoconstricción originada por estimulación de receptores α_2 requiere la entrada de calcio extracelular, ya que se inhibe por antagonistas orgánicos e inorgánicos de los canales de calcio y desaparece en un medio libre de calcio. Los estudios con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ confirman esta hipótesis (Godfraind y cols., 1986). Sin embargo, no existen mecanismos uniformes por los que los agonistas α_2 producen esta entrada de calcio en el músculo liso vascular. En este sentido se encuentra que la entrada de calcio producida por agonista α_2 en vena safena canina, no se debe a la activación de canales de calcio voltaje-dependientes, porque no se observa variaciones significativas del potencial de membrana durante la contracción (Matthews y cols., 1984); además, se requiere mayor concentración de nimodipino (antagonista orgánico de los canales de calcio) para inhibir esta contracción que la que se necesita frente a la originada por despolarización de la membrana (Cooke y cols., 1985). Por otro lado, en vena safena de rata la contracción con los agonistas α_2 está acompañada por la despolarización de la membrana y se produce por entrada de calcio extracelular iniciada por la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes (Cheung y cols., 1985a,b).

El aumento en los niveles de calcio intracelular, independientemente de su origen, no es una respuesta uniforme a la activación de los receptores α_2 en todos los tejidos, tal como sucede a nivel presináptico. Se demuestra que el aumento de calcio intracelular es necesario para el proceso de liberación del neurotransmisor;

por tanto, cabe esperar que la inhibición de la liberación por estimulación α_2 se asocie con una reducción del calcio intracelular. Este fenómeno se observa en sinaptosomas corticales de rata en los que la activación de los receptores α_2 reduce el calcio intracelular (Adamson y cols., 1987). Por consiguiente, al contrario que los receptores α_2 postsinápticos vasculares, la activación de los receptores presinápticos reduce el calcio intracelular, aunque el mecanismo de este efecto no se conoce.

III.2. METABOLISMO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

En la mayoría de los tejidos, los movimientos de calcio producidos por interacción del agonista con el receptor α_1 se cree que son secundarios al aumento del movimiento de fosfatidil inositoles, debido a la activación de la fosfolipasa C (Michell, 1979), mientras que estos mediadores no participan en las respuestas vía receptores α_2 (Reese y Matthews, 1986).

Los productos de hidrólisis del inositol difosfato (IP_2), en respuesta a la activación α_1 , diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), son los segundos mensajeros responsables del proceso de transducción (*Figura 1*). El IP_3 libera calcio del retículo sarcoplasmático (Joseph y cols., 1984; Suematsu y cols., 1985), mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (Kishimoto y cols., 1980), enzima responsable del mantenimiento de la contracción por interaccionar con la quinasa de las cadenas ligeras de miosina (Rasmussen y cols., 1984). También a partir del DAG se forma ácido fosfatídico, que es un ionóforo del calcio y produce una contracción calcio-dependiente del músculo liso (Salmon y Honeyman, 1980).

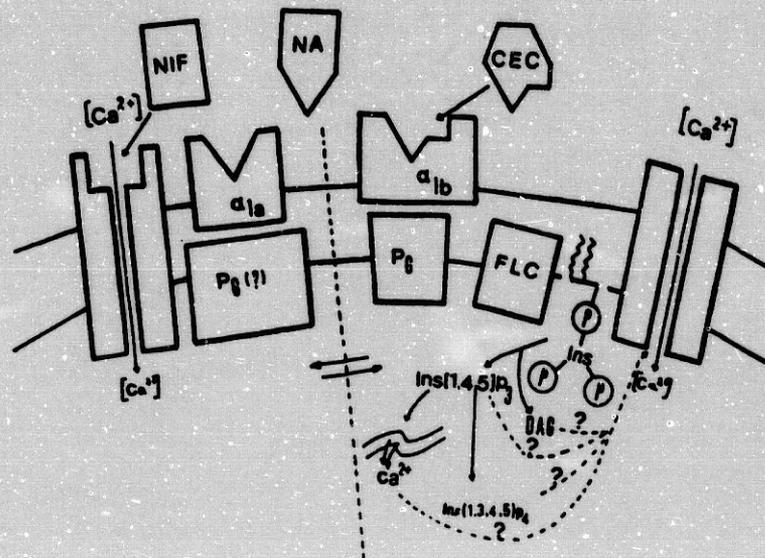


Figura 1: Esquema de los diferentes mecanismos de transducción de la señal de activación por 2 subtipos de receptores α_1 . Fosfolipasa C (FLC); proteína G (P_0); diacilglicerol (DAG); nifedipina (NIF); noradrenalina (NA); cloroetilclonidina (CEC); inositol (Ins). Tomado de Minneman (1988).

Por tanto, existe una correlación entre la hidrólisis de fosfatidil inosoles y los flujos de calcio. La hidrólisis del IP_2 se asocia en el tiempo con la liberación de calcio intracelular y con el componente fásico de la contracción, mientras que la producción de ácido fosfatídico se une temporalmente a la entrada de calcio extracelular y al mantenimiento de la contracción tónica.

Se ha emitido una hipótesis que une la entrada de calcio extracelular y la liberación de calcio intracelular en un único proceso. Poggioli y Putney (1982) proponen que se pueden enlazar el calcio intra y extracelular, porque para el

mantenimiento de los depósitos del retículo sarcoplásmico se requiere calcio extracelular, mientras que el proceso de cargado de depósitos puede ocurrir sin un incremento significativo de los niveles de calcio intracelular libre (Poggioli y Putney, 1982).

Según este esquema la generación de IP_3 , a partir del metabolismo de fosfoinositoles actúa como segundo mensajero para la liberación de calcio intracelular y la entrada de calcio extracelular. Sin embargo, con esta hipótesis no se explican todos los hechos experimentales, por ejemplo, la existencia de agonistas, como el Sgd 101/75, que pueden producir sólo la entrada de calcio extracelular sin una liberación previa de calcio intracelular (Chiu y cols., 1986). Además la activación de los receptores α_1 en arteria caudal de rata produce una respuesta contráctil bifásica, con un componente inicial fásico rápido seguido de un componente tónico lento. Es posible diferenciar estos dos componentes mediante el uso de rianodina, que suprime el componente fásico sin afectar la respuesta tónica, o con nifedipina, que inhibe la respuesta tónica por bloqueo de la entrada de calcio extracelular sin afectar la respuesta fásica (Sulpizio e Hieble, 1991). Estos datos demuestran que, incluso si el papel primario de la entrada de calcio es el de cargar los depósitos intracelulares, entra un exceso de calcio que puede alcanzar un nivel suficiente como para producir la contracción.

Otra lectura de estos datos indica que los dos procesos de movilización de calcio activados por el receptor α_1 pueden operar independientemente y que no se requiere liberación de calcio intracelular para la entrada de calcio extracelular. Por tanto, está claro que el IP_3 no es parte necesaria del proceso de transducción para la entrada de calcio extracelular producida por la activación de receptores α_1 en el músculo liso vascular.

La hidrólisis de los fosfolípidos de membrana también parece ser la base del desarrollo de desensibilización de la respuesta α_1 en músculo liso vascular. La desensibilización de la contracción producida en aorta de conejo por exposición a AD durante 7 horas no se asocia a una pérdida de receptores postsinápticos α_1 , ni a un cambio en la afinidad del agonista, sino a un marcado incremento en el movimiento de fosfoinosítoles.

III.3. INHIBICIÓN DE LA ADENILCICLASA

La inhibición de la adenilciclase es un componente del mecanismo de transducción entre la activación del receptor y la respuesta en la mayoría de las células que poseen receptores α_2 funcionales (Fain y García-Sainz, 1980). Aunque, en la actualidad se cuestiona la importancia de este efecto en la transducción de la señal de activación de estos receptores en todos los sistemas, como en la agregación de plaquetas humanas provocada por AD (Clare y cols., 1984).

La inhibición de la adenilciclase producida por los receptores α_2 se regula a través de una proteína G, que actúa acoplando la activación del receptor con la reducción de la actividad catalítica de la adenilciclase en muchas células; no obstante, el mecanismo preciso de la interacción se desconoce.

La toxina pertussis inactiva esta proteína G, llamada G_i , por lo que la inhibición de la respuesta producida vía receptores α_2 por la toxina, se utiliza como evidencia del papel crítico que juega la inhibición de la adenilciclase en la transducción de estas respuestas en diversos tejidos, tales como adipocitos de hámster, islotes pancreáticos, etc... (Boyer y cols., 1983). Si bien, este hecho no se

cumple siempre en músculo liso vascular. Nichols y cols. (1988, 1989) demuestran que la toxina pertussis inhibe la entrada de calcio extracelular por inactivación de la proteína G, que regula la función del canal de calcio receptor-dependiente y por tanto, que la inhibición que produce esta toxina del efecto contractor provocado por estímulo α_2 no es una prueba definitiva de la importancia de la inhibición de la adenilciclase en la transducción. Además se conoce que si se activa la adenilciclase y aumentan los niveles de AMPc, la activación de los receptores α_2 no reduce los niveles de AMPc intracelulares (Stubbs y cols., 1988).

Por otro lado, el efecto inhibitorio de la liberación de neurotransmisor por activación de los receptores α_2 presinápticos también se atribuye a la inhibición de la adenilciclase (Allgaier y cols., 1985); aun cuando, la inhibición de este efecto por la toxina pertussis es muy pequeña (Nichols y cols., 1988).

Parece deducirse que en algunos sistemas la inhibición de la adenilciclase y la consiguiente reducción de los niveles de AMPc intracelulares es un paso intermedio importante entre la activación del receptor α_2 y la respuesta en el órgano efector; aunque, existen algunas respuestas mediadas por estos receptores que parecen no utilizar este sistema de segundos mensajeros.

III.4. INTERCAMBIO SODIO/HIDRÓGENO

Como se ha comentado anteriormente, los cambios en los movimientos de calcio, la inhibición de la adenilciclase o la estimulación de la fosfolipasa C no son los responsables de todos los procesos de transducción de la señal de activación de los receptores α_1 y α_2 . De ello se infiere que otros sistemas

de segundos mensajeros deben estar implicados en aquellas respuestas en las que los anteriores no jueguen un importante papel. Por ejemplo, en la agregación plaquetaria se piensa que la activación de los receptores α_2 estimula el intercambio Na^+/H^+ a través de la membrana, lo que conduce al aumento del pH intracelular (por la salida de H^+) y a la liberación del calcio unido a la membrana plasmática. La elevación del pH y de la concentración de calcio intracelular activan una secuencia de acontecimientos que originan la agregación plaquetaria (Limbird, 1984).

El resultado de estas investigaciones, en las que se conjugan experiencias funcionales y de biología molecular, permite elaborar los resúmenes recogidos en las *tablas 2 y 3*, relativos a los diferentes subtipos de receptores α .

Tabla 2: Receptores adrenérgicos α_1

Nomenclatura	α_{1A}	α_{1B}	α_{1C}
Orden de potencia	$\text{NA} \geq \text{AD}$	$\text{AD} \geq \text{NA}$	$\text{AD} \geq \text{NA}$
Agonistas selectivos			
Antagonistas selectivos	WB 4101 (9.2)	CEC (irreversible)	WB 4101 (9.2) CEC (irreversible)
Mecanismos de transducción	IP_3/DG	IP_3/DG	IP_3/DG

Tabla 3: Receptores adrenérgicos α_2

Nomenclatura	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}
Orden de potencia	AD \geq NA	AD \geq NA	AD \geq NA
Agonistas selectivos	Oximetazolina (agonista parcial)		
Antagonistas selectivos		Prazosín (7.5) ARC 239 (8.0)	Prazosín (7.5) ARC 239 (8.0)
Mecanismos de Transducción	AMPc ↓ Canal K ⁺ (G) ↑ Canal Ca ²⁺ (G) ↓	AMPc ↓ Canal Ca ²⁺ (G) ↓	AMPc ↓

Tomado de Watson y Abbott (1992)

IV. EFECTOS FARMACOLÓGICOS

Los receptores adrenérgicos α (globalmente considerados como α_1 y α_2), se encuentran ampliamente distribuidos por el organismo, y las acciones farmacológicas resultantes de su estimulación se manifiestan esencialmente a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC), Sistema Cardiovascular, sobre el músculo liso de diferentes órganos y sobre ciertos parámetros metabólicos.

IV.1. A NIVEL DE SNC

La localización exacta de los receptores adrenérgicos α centrales aún no ha sido totalmente desvelada. Las técnicas de fijación de radioligandos han permitido detectar y cuantificar diversos sitios de reconocimiento; estas técnicas han mejorado considerablemente al desarrollar los métodos autorradiográficos *in vitro* que permiten una mejor visualización, y a la cuantificación mediante la aplicación de sistemas de computerización. En cerebro de rata existe una elevada densidad de receptores α_2 en el sistema límbico, nucleus arcuate, locus coeruleus, nucleus tractus solitarii y lámina II del cordón espinal; mientras los receptores α_1 se localizan en bulbo olfatorio y en el gyrus dentatus del hipocampo (Kuhar y cols., 1986; Stahl y cols., 1986).

La función de estos receptores a nivel central, aun no siendo bien conocida, parece jugar un papel importante en procesos como la depresión, síndrome de abstinencia a opiáceos, hipotermia o hipotensión originada por vasodilatación de origen central.

IV.1.1. DEPRESIÓN

Aunque existe gran dificultad para explicar convincentemente el origen de la depresión, hay ciertos hechos que la relacionan con alteraciones en el sistema adrenérgico. La deplección de monoaminas cerebrales con reserpina desencadena a veces un síndrome depresivo, lo que unido al uso de fármacos que aumentan la actividad monoaminérgica, como antidepresivos, permite considerar la depresión como el resultado de una insuficiencia funcional en los sistemas

catecolaminérgicos. En los animales de experimentación se observa que la disminución de la disponibilidad de catecolaminas en las neuronas, produce reducción de la actividad motora, de la conducta exploradora, de la defensa condicionada y de la conducta positiva de recompensa asociada a la autoestimulación. El estudio de agonistas α como productores de depresión, permite comprobar que se trata de los mismos agentes que poseen alta afinidad por receptores α_2 presinápticos periféricos (Bowman y Rand, 1984; Drew y Whiting, 1979).

Al mismo tiempo, se ha comprobado que en estados depresivos existe una supersensibilidad de los receptores α_2 , lo que justifica el uso en clínica de los antidepresivos tricíclicos, cuya eficacia puede relacionarse con la desensibilización de estos receptores (quizás debido al aumento de NA en el espacio sináptico) (Timmermans y cols., 1981; Clougd y Hatton, 1981), o a una disminución de la concentración de los mismos en tratamientos prolongados (Sugrue, 1983; Wang y Aghajanian, 1980).

IV.1.2. SÍNDROME DE ABSTINENCIA POR OPIÁCEOS

Se conoce que en el síndrome de abstinencia a opiáceos intervienen mecanismos mediados por receptores α_2 . Utilizando como modelo experimental la plaqueta sanguínea, rica en estos receptores, se pone de manifiesto como en las plaquetas de pacientes con depresión endógena y en adictos a la heroína con síndrome de abstinencia se produce una mayor fijación específica de ^3H -clonidina que en los pacientes controles, al tiempo que se encuentran aumentadas las respuestas funcionales del receptor α_2 (Crews y Smith, 1978; García Sevilla y cols.,

1983; García Sevilla y cols., 1984; García Sevilla y cols., 1986b). Estos resultados sugieren que la abstinencia a la heroína se asocia a una supersensibilidad del receptor α_2 plaquetario. Sería interesante extrapolar este modelo plaquetario a los estudios de receptores α_2 cerebrales, si bien recientes trabajos parecen ratificar estos hechos utilizando zonas específicas del SNC (García Sevilla y cols., 1986a).

Probablemente, el proceso adaptativo de este receptor inhibitorio, refleja mecanismos de contrarregulación que tienden a suprimir la masiva liberación de NA responsable de una buena parte de los efectos observados durante el síndrome de abstinencia. La modulación de este tipo de receptor parece ser un mecanismo decisivo para contrarrestar los síntomas de la abstinencia a opiáceos (García Sevilla, 1987).

IV.1.3. HIPOTERMIA

Todos los agonistas de los receptores adrenérgicos α causan hipotermia, y aunque se piensa que este efecto no guarda relación con la afinidad α_1/α_2 (Drew y Whiting, 1979), trabajos más recientes parecen indicar que existe una mayor reducción de la temperatura corporal en el caso de agonistas α_2 (xilacina y UK 14,304) que en el de agonistas α_1 (FE) (Colpaert, 1986). No existe unanimidad a la hora de designar el o los receptores responsables del efecto hipotérmico, ya que a lo expuesto anteriormente se añade la opinión de otros autores (Myers y cols., 1987) en el sentido de implicar tanto a receptores α_1 como a α_2 en los mecanismos de termorregulación.

IV.1.A. HIPOTENSIÓN PRODUCIDA POR UNA VASODILATACIÓN DE ORIGEN CENTRAL

La introducción en terapéutica de determinados agonistas α , especialmente α_2 (CLO), mostró la influencia de estos receptores en la hipotensión. Este efecto hipotensor contrasta con la acción vasoconstrictora directa que originan estos fármacos (Flórez, 1987b), que conduciría a la aparición de hipertensión.

Estudios posteriores demuestran que el efecto hipotensor inducido por CLO tiene origen en el SNC (Kobinger, 1978; Onesti y cols., 1971). Mediante la utilización de antagonistas selectivos, tanto de receptores α_2 (yohimbina, rauwolscina) como de receptores α_1 (corinantina), se observa que los receptores centrales que median este efecto son del tipo α_2 .

Para explicar el mecanismo de acción hipotensora a nivel central se aceptan las siguientes hipótesis:

a. A nivel medular

La presencia de receptores α modula la respuesta vagal mediada por el *reflejo baroreceptor* (Hutchet y cols., 1981). Los receptores α_1 inhiben esta transmisión y los α_2 la facilitan (Kobinger, 1975). La CLO (agonista α_2) estimula la respuesta vagal, originando bradicardia, y consiguientemente hipotensión. Este hecho concuerda con los resultados experimentales obtenidos por Laubie y cols. (1976), quienes, utilizando gatos desmedulados (excluida la función simpática cerebral) comprobaron que la administración de CLO producía una bradicardia por estimulación vagal dependiente de la información de los baroreceptores.

b. A nivel cerebral

Existen dos hipótesis que pretenden explicar la actuación de la CLO a este nivel (Van Zwieten y Timmermans, 1983):

1) La CLO al estimular los receptores α_2 postsinápticos centrales estimula la neurona inhibidora y disminuye la actividad simpática periférica, causando un efecto hipotensor.

2) La CLO estimula los receptores α_2 presinápticos y por tanto inhibe la liberación de NA central, causando la inhibición de la neurona facilitadora y la disminución de la actividad simpática periférica, lo que conduce a un efecto hipotensor.

Kobinger y Klupp (1975) comprueban que tras la anulación farmacológica de las vías y receptores presinápticos centrales (tratamiento con reserpina y dopamina), no desaparece el efecto hipotensor central derivado de la actuación de la CLO y fármacos relacionados. Por este motivo justifican el mencionado efecto por un mecanismo postsináptico.

IV.2. A NIVEL DE SISTEMA CARDIOVASCULAR

A este nivel se encuentran receptores α tanto en corazón como en vasos.

VI.2.1. CORAZÓN

La activación de los receptores α cardiacos produce modificación en la contractilidad y en las propiedades eléctricas del corazón. Se acepta que los receptores α cardiacos postsinápticos implicados en estas respuestas son del tipo α_1 (Hu y cols., 1986). Sin embargo, las características farmacológicas de estos receptores α_1 cardiacos parecen ser distintas a las presentadas por los del músculo liso (Hiramoto y cols., 1988).

a. Contractilidad

Numerosas experiencias pretenden evidenciar la influencia de receptores α en esta propiedad; para ello se utilizan tejidos auriculares y ventriculares de diferentes especies animales y del hombre (Ask y cols., 1987; Kushida y cols., 1988; Otani y cols., 1988).

La estimulación de los receptores α_1 de músculos papilares de rata por FE (en presencia de propranolol) produce una respuesta trifásica: a) efecto inotrópico positivo transitorio, b) efecto inotrópico negativo transitorio, c) efecto inotrópico positivo sostenido (Otani y cols, 1988; Otani, 1988).

La explicación de la existencia de diferentes fases en la respuesta inotrópica se realiza en función de la secuencia de acontecimientos derivados de la activación de estos receptores: la formación de IP_3 por el metabolismo de fosfoinosítidos produce efectos inotrópicos transitorios por movilización de calcio intracelular, mientras que el DAG parece ser responsable de la fase sostenida por apertura de canales de calcio a través de la activación de la proteína quinasa C (Otani, 1988; Scholz y cols., 1988).

Este efecto inotrópico positivo puede tener significación clínica en la insuficiencia cardíaca. El corazón insuficiente se caracteriza por la desensibilización de receptores β , por tanto, los estimulantes α adrenérgicos pueden ser utilizados para mejorar el estado inotrópico (Gengo y cols., 1988).

b. Propiedades eléctricas

La FE prolonga la duración del potencial de acción cardíaco (DPA) e incrementa el potencial de membrana en reposo (hiperpolarización). La prolongación de la DPA coincide con la fase inotrópica positiva y la hiperpolarización con la fase inotrópica negativa y se mantiene durante la fase inotrópica positiva sostenida (Tohse, 1988). Estos cambios electrofisiológicos se manifiestan también con un efecto cronotrópico negativo.

Recientes experiencias usando agonistas α_1 (FE) indican que la estimulación de estos receptores produce, en primer lugar, una ligera despolarización como consecuencia de la disminución de la conductancia al potasio. Este cambio del potencial de membrana induce la activación de la corriente de sodio que origina la despolarización completa. El aumento en la entrada de sodio puede incrementar la

entrada de calcio por activación del mecanismo de intercambio Na^+ - Ca^{2+} . La mayor entrada de calcio puede contribuir la efecto inotrópico positivo en respuesta a FE (Jahnel y cols., 1991).

VI.2.2. VASOS

Son muy numerosos los estudios realizados en diferentes preparaciones de músculo liso de distintas especies animales (Beckeringh y cols. 1984; Ruffolo y cols. 1991b), y todos ellos coinciden en el hecho de que la estimulación de receptores α produce vasoconstricción. Se acepta que en el músculo liso vascular existen tanto receptores α_1 como α_2 , y que median la respuesta contráctil, aunque activando diferentes procesos moleculares (Beckeringh y cols. 1984). La complejidad de la localización anatómica de los diferentes tipos de receptores ya se ha señalado en el apartado II.

De todo lo expuesto se deduce que el resultado de la acción cardiovascular de los fármacos α adrenérgicos es la producción de una hipertensión arterial. Si bien, algunos de ellos (CLO y análogos) originan una acción antihipertensiva, que se explica por la influencia de los receptores α sobre el SNC.

IV.3. A NIVEL DE APARATO DIGESTIVO

En las *glándulas salivares* se encuentran receptores α_1 cuya estimulación origina una ligera secreción acuosa (Bowman y cols., 1970; Goodman y Gilman, 1991).

En el *estómago e intestino* se localizan también tanto receptores adrenérgicos α_1 como α_2 , que median diferentes respuestas (Bauer, 1981; Bauer, 1982; Fagbemi y Salako, 1982).

Se ha podido comprobar utilizando íleon aislado de diversos animales, que existen receptores α_1 postsinápticos excitatorios que median la contracción, y receptores α_2 postsinápticos inhibitorios que median la relajación. También se han encontrado receptores α_2 presinápticos localizados en las neuronas colinérgicas, cuya activación inhibe la liberación de ACh y disminuye la respuesta contráctil derivada de la estimulación nerviosa colinérgica (Flórez, 1987c).

Estos hechos demuestran el importante papel que desempeñan los receptores α_2 en el control de la motilidad intestinal, y al mismo tiempo explican la actividad antidiarreica de la CLO y otros agonistas α_2 (Doherty y cols., 1983).

IV.4. A NIVEL DE APARATO RESPIRATORIO

La presencia de receptores α en el músculo liso bronquial ha sido ampliamente demostrada (Advenier y Floch-Saint-Aubin, 1984; Kamikaya y Shimo, 1986), aunque los efectos derivados de su estimulación no son del todo conocidos. Experiencias con tráquea y tiras de pulmón aislados de cobaya ponen de manifiesto que fármacos agonistas α_1 como la FE y la metoxamina, producen un efecto contractor en ambas preparaciones, y que este efecto se inhibe por fentelamina. Contrariamente a lo que podría deducirse, estos fármacos no modifican la resistencia aérea pulmonar, e incluso disminuyen el efecto que sobre la misma inducen ACh, histamina y serotonina. Este efecto es antagonizado por el prazosín (antagonista

selectivo α_1). La aparente incoherencia entre broncoconstricción y mejora del flujo aéreo se explica en base a que la vasoconstricción inducida por estos agentes origina una descongestión de la mucosa bronquial (vías respiratorias bajas) y también de las fosas nasales y faringe (vías respiratorias altas), mejorando con ello la ventilación.

Experiencias en tráquea de cobaya previamente tratadas con propranolol, permiten observar una marcada contracción al añadir NA y CLO, que es leve en el caso de la FE. La respuesta de NA y CLO es inhibida por yohimbina, pero no por prazosín, lo que lleva a deducir que los receptores α_2 son los responsables de esta respuesta (Takayanagi y cols., 1990).

IV.5. A NIVEL DE APARATO GENITOURINARIO

En *vejiga urinaria*, se observa una mayor respuesta contráctil cuando se estimula por NA y FE que por CLO. Además este efecto se inhibe por prazosín selectivamente; por lo que se deduce la presencia predominante de receptores α_1 (Tsujimoto y cols., 1986). La estimulación de estos receptores también origina contracción del trígono y del esfínter.

En *uréteres* existen receptores α_1 , cuya estimulación produce incremento de la motilidad y del tono.

En el *riñón* los receptores α_2 predominan numéricamente. Su densidad está aumentada en ratas genéticamente hipertensas, pero se incrementa más aún con una dieta alta en Na^+ , incluso antes de que el Na^+ eleve la presión arterial. Por otra

parte el bloqueo con yohimbina altera la densidad de estos receptores en riñón y disminuye la presión arterial.

La *vesícula seminal* y el *conducto deferente* poseen receptores α_1 y α_2 , de cuya estimulación se origina una respuesta contráctil (Roquebert y cols., 1983; Docherty y Grath, 1984). En conducto deferente existen diferentes poblaciones de receptores en la porción prostática y epididimal, siendo mucho menor la sensibilidad a los agonistas α_1 de la porción prostática (Brito y cols., 1989).

IV.6. A NIVEL DE METABOLISMO

a. Acción hiperglucemiante

La administración oral y/o venosa de agonistas α_2 (CLO), produce hiperglucemia en diferentes especies de animales y en el hombre, respuesta que es bloqueada por antagonistas de receptores α_2 como la yohimbina (Di Tullio y cols., 1984). Para explicar esta acción hiperglucemiante se han propuesto diversas hipótesis; de ellas se puede concluir que el estímulo de receptores α_2 facilita la gluconeogénesis y la secreción de glucagón e inhibe la secreción de insulina (Jard y cols., 1981; Morantinos y cols., 1986; Nakaki y cols., 1981; Brown y cols., 1985; Knudtzon, 1984; Maroto y cols., 1987).

b. Efecto antilipolítico

Trabajos realizados ponen de manifiesto la presencia de receptores α_2 en adipocitos de diferentes especies animales, incluyendo al hombre, cuya activación origina un efecto antilipolítico (Lafontan y Berlan, 1980; Carpené y cols., 1983).

El significado funcional de estos adrenoreceptores α_2 en el control de la lipólisis se observa en distintas situaciones metabólicas. Durante el ayuno y la restricción calórica la receptividad α_2 aumenta, atenuándose así la intensa movilización lipídica esperada. El envejecimiento y la obesidad se acompañan de un incremento en el número de *lugares de unión* específica α_2 y el consiguiente debilitamiento de la respuesta lipolítica producida por catecolaminas; la pérdida de peso restablece la respuesta lipolítica al mismo tiempo que se atenúa el efecto α_2 y se reduce la población de estos receptores.

IV.7. A OTROS NIVELES

Sobre el *ojo* se produce midriasis, como consecuencia de la contracción del músculo liso radial por estimulación α_1 .

En las *plaquetas sanguíneas* son numerosos los trabajos que señalan la presencia mayoritaria de receptores α_2 , que al ser estimulados originan agregación de las mismas.

PARTE
EXPERIMENTAL

**MATERIAL
Y
MÉTODOS**

0. INTRODUCCIÓN

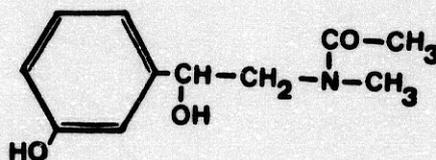
0.1. FÁRMACOS UTILIZADOS

N-ACETILFENILEFRINA

La obtención e identificación de la N-acetilfenilefrina ha sido realizada en el Departamento de Química Física de esta Universidad por la Lda. F. Carazo.

Química

Figura 2: Estructura química de la N-acetilfenilefrina.



Nombre: N-[2-hidroxi-2-(m-hidroxifenil)-etil]-N-metilacetamida

Obtención

Se ha procedido según el método descrito por Halmekoski (1967). Se hace reaccionar el clorhidrato de la FE con anhídrido acético en un medio que contiene acetato sódico. De la mezcla de reacción precipita un sólido blanco, que es rápidamente lavado en agua fría.

Identificación

- Punto de fusión: 175°C
- Análisis elemental: C (62.9%); H (7.3%) y N (6.7%), que corresponde a una fórmula empírica $C_{11}H_{15}NO_2$.
- Cromatografía en capa fina: fase móvil cloroformo:etanol 9:1 (v:v); fase estacionaria silicagel 60 PF₂₅₄; revelador luz ultravioleta de 254 nm; aparece una sola mancha con $R_f = 0.34$.
- Bandas de absorción de infrarrojo (IR): Podemos destacar las señales 3460-3440, que corresponden a un grupo OH, y 1585, que corresponde a un grupo C=O.

OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS: Clorhidrato de fenilefrina (Laboratorios Boehringer Ingelheim, Barcelona, España); acetilcolina (Laboratorios Merck, Darmstadt, Alemania); clorhidrato de prazosín (Laboratorios Sigma, St. Luis, USA); clorhidrato de propranolol (Laboratorios Sigma, St. Luis, USA); clorhidrato de verapamilo (Laboratorios Sigma, St. Luis, USA); pentobarbital sódico (Laboratorios Sigma, St. Luis, USA).

0.2. ANIMALES UTILIZADOS

Para la realización de nuestras experiencias hemos utilizado animales suministrados por el Servicio de Animales de Laboratorio perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Los animales con los que se ha trabajado han sido:

- . Rata albina de la cepa Wistar, de ambos sexos, según el tipo de experiencia, y de 200-300 g de peso.

- . Ratón albino de la cepa Swiss-OFI, hembras, y de 20-25 g de peso.
- . Cobaya albino de la cepa Dunkin-Hartley, de ambos sexos, según el tipo de experiencia, y de 300-400 g de peso.

Para su alojamiento los animales se han mantenido en jaulas con lecho de viruta, dispuestas en rack de acero inoxidable; han recibido una dieta de piensos especial para animales de laboratorio (Panlab), con un consumo variable en función del tipo de animal, edad y peso; y agua *ad libitum*. También han sido sometidos a controles periódicos (análisis nutritivos, metales pesados y contaminantes bacteriológicos).

Antes de su utilización, los animales han sido mantenidos en nuestro estabulario durante unos 5 días, con controles de luz y temperatura (20-24°C) (Consejo de las Comunidades Europeas, 1986).

0.3. ESTADÍSTICA

La comparación de los resultados obtenidos se realiza por el procedimiento de la "t" de Student. La ecuación de la recta se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

I. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

I.1. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda se expresa por la DL_{50} , que se define como la dosis de fármaco que produce la muerte de la mitad de los animales. Para su cálculo se ha seguido el método previamente descrito por Miller y Tainter (1944).

I.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA Y DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

Como animal de experimentación se han empleado ratones albinos, sometidos a un ayuno previo de 18 h, y distribuidos en lotes de 6. A los animales de cada lote se les administra por vía intraperitoneal 0.5 ml de solución bien de FE o bien de NAF, a dosis comprendidas entre 100-1000 mg/kg.

Una vez administrados los ratones se colocan en jaulas, realizándose un control de los animales vivos y muertos durante las horas posteriores a la administración, y observando los fenómenos que puedan producirse. Transcurridas 3 h se les permite comer, y a las 24 h se realiza el último recuento, anotando la relación final vivos/muertos para cada grupo.

I.1.2. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para realizar el cálculo de la DL_{50} se recuenta el número de animales muertos a las 24 horas para cada dosis, se transforman en porcentaje de mortalidad, y estos a su vez en probits. En los casos en que las dosis administradas provoquen un 0% o un 100% de mortalidad, los probits correspondientes no tendrían un valor finito, por lo que se calculan sus valores aproximados mediante la siguiente transformación:

- Para un 0 % de mortalidad:

$$\frac{1/n}{n} \times 100$$

- Para un 100 % de mortalidad:

$$\frac{n - 1/n}{n} \times 100$$

donde n es el número de animales en cada lote.

La representación gráfica se realiza llevando a ordenadas los probits calculados y a abscisas los logaritmos de las dosis. Una vez efectuada la representación, la DL_{50} se obtiene directamente de la gráfica, mediante la lectura de

la dosis que corresponde al 50% de mortalidad (probit 5). La desviación estándar se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$S = \frac{DL_{01\%} - DL_{10\%}}{2}$$

Por último, el error estándar se calcula según la fórmula:

$$\frac{2 S}{\sqrt{2 N}}$$

donde S es la desviación estándar y N el número total de animales utilizados.

II. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

II.1. EFECTOS SOBRE SISTEMA CARDIOVASCULAR

II.1.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

II.1.1.a. Método cruento

Descripción de la técnica y desarrollo de la experiencia

Se emplean ratas Wistar machos de aproximadamente 200 g de peso, que son anestesiadas con éter. Se les canula la vena yugular derecha y la arteria carótida izquierda, para la administración de los fármacos y el registro de la presión

arterial respectivamente. Una vez que los animales están conscientes (24 horas después de la implantación de las cánulas), los valores de presión arterial se recogen de forma continuada por medio de un transductor de presión Bell and Howell, acoplado a un registro Dynograph Beckman type R411 (Zarzuelo y cols, 1991). Con posterioridad, se determina el incremento de presión sistólica producido por dosis únicas intravenosas de cada fármaco, FE (dosis de 5, 50, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y NAF (dosis de 10, 100, 1000, 2500 y 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En todos los casos se inyectan 0.05 ml/100 g de peso corporal.

Expresión de resultados

Con los resultados obtenidos se construye una gráfica en la que se representan los incrementos de presión arterial en función del logaritmo de la dosis administrada.

II.1.1.b. Método incruento

Descripción de la técnica y desarrollo de la experiencia

Se utilizan ratas Wistar machos de un peso aproximado \approx 300 g, se agrupan lotes de 8 animales.

La presión arterial se mide después de la vasodilatación de la cola por calor en una estufa a 37°C durante aproximadamente 20 min. Se determina la presión sistólica por registro de la desaparición del pulso en la cola, con un transductor presoeléctrico y un registro digital Letica LE 5000.

Antes de la administración de los fármacos se mide la presión arterial diariamente durante un periodo de adaptación que excluye del estudio aquellos animales que presentan variaciones significativas de presión arterial. Los fármacos ensayados, FE (dosis de 0.166, 0.332 y 0.664 mg/kg) y NAF (dosis de 20 y 83 mg/kg), se administran oralmente en un volumen constante de 1 ml, después de haber sometido a los animales a un ayuno de 24 h. La presión arterial se mide inmediatamente y tras 1, 2, 3, 4 y 24 horas de la administración.

Expresión de resultados

Se realiza una representación gráfica con la modificación porcentual en relación a la basal, de los valores de presión arterial frente al tiempo y se comparan con los presentados por un lote en blanco.

II.1.2. EFECTOS SOBRE MÚSCULO LISO VASCULAR: AORTA AISLADA DE RATA

II.1.2.a. Descripción de la técnica

Se realiza la técnica descrita por Furchgott (1960) empleando ratas Wistar con un peso de 200-250 g.

Se sacrifica el animal mediante traumatismo retrocervical y posterior exanguinación por arteriotomía carotídea. Seguidamente se realiza una incisión a nivel de la cavidad torácica y se separa un segmento de aorta, que se mantiene en solución nutritiva a 37°C con oxigenación constante. Se eliminan los elementos de

tejido conjuntivo y adiposo. Con ayuda de una fina barra de vidrio, que se introduce a lo largo de la luz del vaso, y unas tijeras puntiagudas se realiza un corte en espiral del órgano. Esta operación se lleva a cabo cuidando la integridad del endotelio vascular. La presencia de endotelio en la aorta se confirmó por el efecto relajante de la ACh (10^{-5} M) frente a la contracción provocada por 10^{-5} M de FE. En otro grupo de preparaciones se elimina el endotelio mecánicamente.

La tira resultante, de unos 2 mm de anchura y 3 cm de longitud, se liga en sus extremos y se monta en el baño de órganos, de forma que uno de ellos quede unido al fondo del vaso y el otro a un transductor isométrico (Letigraph 2000, Letica) conectado a un registro (Uni-graph 1000-506, Letica). Cada órgano así montado se somete a una tensión inicial de 1 g, manteniendo el baño termostatado a una temperatura de 37°C y sometido a oxigenación constante con carbógeno (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono).

La solución nutritiva, solución Krebs-Henseleit modificada por Furchgott (solución KS), posee la siguiente composición (en mM): NaCl 118, KCl 5.36, CaCl_2 2.52, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 y glucosa 10.

II.1.2.b. Desarrollo de la experiencia

Una vez efectuado el montaje del órgano, se deja estabilizar durante 1 h, realizando lavados cada 20 min. Para la obtención de resultados se utilizan los siguientes protocolos experimentales:

a) Adición de concentraciones crecientes de los fármacos en estudio, FE (10^{-6} - 1.3×10^{-5} M) o NAF (10^{-6} - 1.2×10^{-3} M) con un intervalo de cinco minutos

(Van Rossum, 1963), a aortas con endotelio y sin endotelio, con objeto de obtener una curva concentración-respuesta.

b) En algunos experimentos, una vez obtenidas dos curvas concentración-respuesta casi idénticas para el agonista, se adiciona prazosín, bloqueante α_1 , (10^{-9} y 5×10^{-9} M) o verapamilo, antagonista del calcio, (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) 30 min antes de obtener una nueva curva dosis-respuesta de FE o NAF.

c) La capacidad de la FE (10^{-5} M) y el NAF (10^{-4} M) de movilizar calcio intracelular se estudia sobre aortas incubadas en una solución KS libre de calcio y adicionadas de 2 mM de EDTA. En estas condiciones ambos agonistas producen una contracción transitoria. A los 5 min de actuación, se lava la preparación con la solución libre de calcio y se repite este protocolo hasta conseguir suprimir el efecto contráctil. A continuación se exponen las tiras durante 5 min a 2.7 mM de calcio KS para llenar de nuevo los depósitos de calcio en el músculo. Posteriormente se vuelven a incubar en un medio libre de calcio y se repite la adición de FE o NAF hasta conseguir contracciones similares (Karakı y cols., 1979; Pérez-Vizcaıno y cols., 1991).

d) En 6 aortas con endotelio intacto se estudia el efecto relajante de la ACh (10^{-5} M) frente a la contracción previa con FE (10^{-5} M). Después del lavado de la preparación y estabilización durante 60 min se adicionan 10^{-4} M de NAF, y cuando la contracción alcanza un valor máximo, se vuelve a adicionar ACh (10^{-5} M).

II.1.2.c. Expresión de resultados

Con los resultados obtenidos mediante la aplicación de los distintos protocolos experimentales se construyen las correspondientes curvas dosis-respuesta de FE y NAF, que permiten calcular el valor del logaritmo negativo de la concentración molar que produce el 50% de $E_{máx}$ (pD_2). También se calcula la actividad intrínseca, asignando el valor 1 al $E_{máx}$ alcanzado por la FE.

El efecto de los fármacos sobre el calcio intracelular y la relajación originada por la ACh en las aortas previamente contraídas por los fármacos en estudio, se representan gráficamente en función del tiempo. El parámetro a valorar es la tensión presentada por la NAF en función de la presentada por la FE.

II.1.3. EFECTOS SOBRE EL MÚSCULO CARDIACO: AURÍCULA AISLADA DE COBAYA

II.1.3.a. Descripción de la técnica

El método empleado es similar al descrito por Stewart (1958), modificado para aurícula de cobaya por Barrigón y cols. (1982) y Díez y cols. (1985).

Los animales se sacrifican mediante un golpe en la nuca y posterior decapitación. Inmediatamente se realiza una toracotomía, se extrae el corazón, que se coloca en una placa *Petri* que contiene solución Tyrode oxigenada y caliente y se procede a la disección de las aurículas. Éstas se conectan por su base a un

electrodo de platino y por el reborde auricular a un transductor fuerza-desplazamiento; a continuación se colocan en posición vertical en copas de Allhin que contienen 20 ml de solución de Tyrode aireada con carbógeno (37°C) y se ajusta su tensión basal mediante un tornillo micrométrico a 1 g.

En estas condiciones, las aurículas derechas laten espontáneamente a una frecuencia comprendida entre 150 y 230 latidos por minuto (lpm). Las aurículas izquierdas, no automáticas, se estimulan mediante electrodos bipolares de platino con pulsos rectangulares de 1 ms de duración (intensidad 30-40% del umbral) a la frecuencia de 1 Hz. Los electrodos se conectan a un estimulador eléctrico Cibertec CS-14. El registro de la actividad contráctil se realiza de forma isométrica utilizando transductores fuerza-desplazamiento Letigraph 2000 (Letica) conectados a un registro Uni-graph 1000-506 Letica. Las aurículas se estabilizan durante al menos 30 minutos antes de iniciar los protocolos experimentales.

La solución Tyrode posee la siguiente composición (mM): NaCl 137, KCl 5.4, Ca₂Cl 1.8, MgCl₂ 1.05, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.42 y glucosa 5.5.

II.1.3.b. Desarrollo de la experiencia

En estos experimentos, tras el período de estabilización, se añaden dosis acumulativas de los fármacos en estudio, FE (10⁻⁶-10⁻⁴ M) y NAF (10⁻⁷-10⁻⁴ M) registrando de forma continua los efectos del fármaco. El intervalo entre las dosis es de 5 min, ya que en experimentos preliminares se había comprobado que en ese momento los efectos del fármaco habían alcanzado valores estables. Los parámetros registrados son la fuerza de contracción y la frecuencia de aurículas derechas y la fuerza de contracción en las aurículas izquierdas.

II.1.3.c. Expresión de resultados

Con los datos obtenidos se construyen las correspondientes curvas dosis-respuesta, representamos en abscisas el logaritmo de la dosis, y en ordenadas los efectos expresados en % respecto a los valores control. A partir de estas curvas se determinan los E_{max} alcanzados para cada fármaco, así como el valor de la DE_{50} .

II.2. EFECTOS A OTROS NIVELES

II.2.1. EFECTOS SOBRE EL SNC

Se han efectuado una batería de pruebas que nos permitan detectar una posible actividad estimulante o depresora de estos fármacos sobre el SNC.

II.2.1.a. Descripción de las técnicas

Test de la curiosidad

Cada ratón (lotes de 6) se sitúa en el centro de una plancha de trous (Panlab) con 16 orificios, de dimensiones 40 x 40 cm. Se contabiliza el número de veces que el animal introduce la cabeza en los orificios (Boisier y Simon, 1967) durante 1 hora. Las medidas se anotan (Registro Panlab) a los 5, 15, 30, 45 y 60 min. Hay que hacer constar que si el animal introduce la cabeza en el mismo orificio sólo se contabiliza una vez.

Determinación de la actividad motora

Los animales (lotes de 5) se introducen en la jaula de comportamiento Ugo Basile 7401, y se procede a efectuar la lectura de los movimientos (Tintore, 1981), registrándose cada 30 minutos, durante 12 horas.

En el transcurso de la experiencia se procuran mantener constantes las siguientes condiciones de trabajo: hora de administración = 14 h; hora de comienzo de las medidas = 14 h, 15 min.; hora de recogida de las medidas = 9 h. Durante las 12 h de registro de movimientos los animales permanecen en oscuridad.

Modificación del tiempo de sueño barbitúrico

Para estudiar la modificación en el tiempo de sueño se determina el intervalo de latencia y de sueño. Por tiempo de latencia se considera el periodo transcurrido desde la administración del barbitúrico hasta el inicio del sueño, que viene indicado por la desaparición del *righting reflex*, por lo que el animal permanece en la posición en que se le coloca (decúbito) sin recuperar la posición de marcha. Como finalización del periodo de sueño (despertar), se considera la recuperación de dicho reflejo.

Para llevar a cabo este estudio dividimos los ratones en dos grupos. A los animales de uno de los grupos se les administra por vía intraperitoneal únicamente la solución de barbitúrico (Nembutal) a una dosis de 50 mg/kg (lote blanco).

A cada lote (6 animales) del segundo grupo de animales se le administra el fármaco problema y el barbitúrico; el volumen total administrado con los 2 fármacos sumará 0.5 ml. Se realizarán medidas del tiempo de latencia y el de sueño.

II.2.1.b. Desarrollo de la experiencia

A cada ratón se le administran intraperitonealmente FE, a dosis de 2, 4, 8 y 16 mg/kg, y NAF, a dosis de 1000 mg/kg, disueltos en un volumen de 0.5 ml; a un lote se le inyecta vehículo (lote blanco).

II.2.2. EFECTOS SOBRE EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL: TRÁQUEA AISLADA DE COBAYA

II.2.2.a. Descripción de la técnica

Para realizar esta técnica (Emmerson y Mackay, 1979), se han empleado cobayas de 300-400 g de peso de cualquier sexo.

Sacrificamos el animal mediante un golpe en la nuca con desangrado total. A continuación se efectúa una incisión a nivel del cuello y, separando los planos musculares, se observa la tráquea. Se disecciona y se mantiene en solución nutritiva a 37°C con oxigenación constante, procediéndose a eliminar las adherencias.

Una vez limpio el órgano se visualiza el músculo liso, de modo que por el lado opuesto a éste se secciona la tráquea en sentido longitudinal. Se extiende el órgano cortado y por los extremos se fija con alfileres a una placa de corcho; se hacen unos cortes transversales incompletos a intervalos iguales y a ambos lados de la preparación, resultando la tráquea cortada en *zig-zag*.

Seguidamente montamos la preparación en el baño de órganos de forma que uno de los extremos quede unido al fondo de la copa y el otro al transductor. El órgano se somete a una tensión inicial de 0.5 g; manteniendo el baño termostatado a 37°C y sometido a oxigenación constante con carbógeno.

La solución nutritiva utilizada, solución Krebs modificada por Hukovic, posee la siguiente composición (mM): NaCl 94.7, KCl 4.7, CaCl₂ 1.4, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 2.4 y glucosa 11.7.

II.2.2.b. Desarrollo de la experiencia

Una vez efectuado el montaje del órgano, se deja estabilizar durante 1 hora aproximadamente. Transcurrido dicho tiempo se adiciona al baño ACh (10^{-5} M). Cuando la contracción se estabiliza, se comienza a añadir concentraciones crecientes acumulativas (Van Rossum, 1963) de los fármaco en estudio, FE (10^{-5} - 1.3×10^{-2} M) y NAF (5×10^{-4} - 10^{-1} M), a intervalos de 5 min.

II.2.2.c. Expresión de resultados

Los datos obtenidos permiten construir la correspondiente curva dosis-efecto inhibitor.

Para comparar cuantitativamente los fármacos calculamos el porcentaje de inhibición y la IC_{50} , que corresponde a la dosis que inhibe (relajación) el 50% del efecto contractor de la ACh.

II.2.3. EFECTOS SOBRE EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

II.2.3.a. Descripción de la técnica

Para la realización de esta técnica (Leach, 1956), se emplean ratas Wistar machos con un peso de 200-250 g.

Se sacrifica el animal mediante un golpe en la nuca y se realiza un desangrado total. Mediante una incisión a nivel de las bolsas escrotales se pone al descubierto el testículo. Sobre el mismo se encuentra una formación alargada que es el epidídimo, de cuya porción más delgada parte un cordón blanquecino que desemboca a nivel prostático. Este cordón es el conducto deferente. Su disección debe incluir la porción que va desde la cola del epidídimo a la próstata.

Con el fin de limpiar la grasa envolvente y las adherencias mesentéricas, se lleva el órgano a una placa *Petri* con solución nutritiva a una temperatura de 31°C y con oxigenación constante con carbógeno. Finalmente se liga por los extremos y se coloca en el baño de órganos, de modo que la porción que contacta con la próstata (la más gruesa) esté más próxima a la entrada de oxígeno al baño; el extremo opuesto se une al transductor. El órgano se somete a una tensión inicial de 1 g, permaneciendo el baño termostatado a 31°C y con oxigenación constante con carbógeno.

La solución nutritiva usada es la solución Krebs, cuya composición es (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.4, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.1, MgSO₄·7H₂O 1.2 y glucosa 11.1.

II.2.3.b. Desarrollo de la experiencia

Una vez realizado el montaje, se deja estabilizar el órgano durante 30 minutos, antes de adicionar FE (10^{-5} - 10^{-4} M) o NAF (10^{-4} - 10^{-2}) para obtener las correspondientes curvas dosis-respuesta.

II.2.3.c. Expresión de resultados

Con los datos obtenidos se construye una gráfica en la que se representa en abscisas el logaritmo de la concentración del fármaco y en ordenadas el efecto expresado en % respecto al $E_{máx}$. Se calcula el pD_2 , así como la actividad intrínseca, asignando el valor 1 al $E_{máx}$ alcanzado por la FE.

RESULTADOS

I. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

I.1. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD AGUDA

La administración de FE (100-1000 mg/kg) a distintos lotes de ratones produce la aparición de una serie de efectos de forma dosis-dependiente, tales como piloerección, taquicardia, convulsiones, etc., previos a su muerte.

La letalidad aguda que origina la FE es también dependiente de la dosis (*Figura 3*). El valor de la DL_{50} calculado para la FE es de 490.2 ± 24.0 mg/kg ($n=6$). Sin embargo cuando se administra NAF (1000 mg/kg) no se observa la muerte de ninguno de los animales, ni el desarrollo de efectos similares a los originados por la FE. El valor de la DL_{50} para la NAF no se ha calculado exactamente debido a su baja solubilidad en agua, y por tanto, a la dificultad para administrarla; considerándola en cualquier caso superior a 1000 mg/kg.

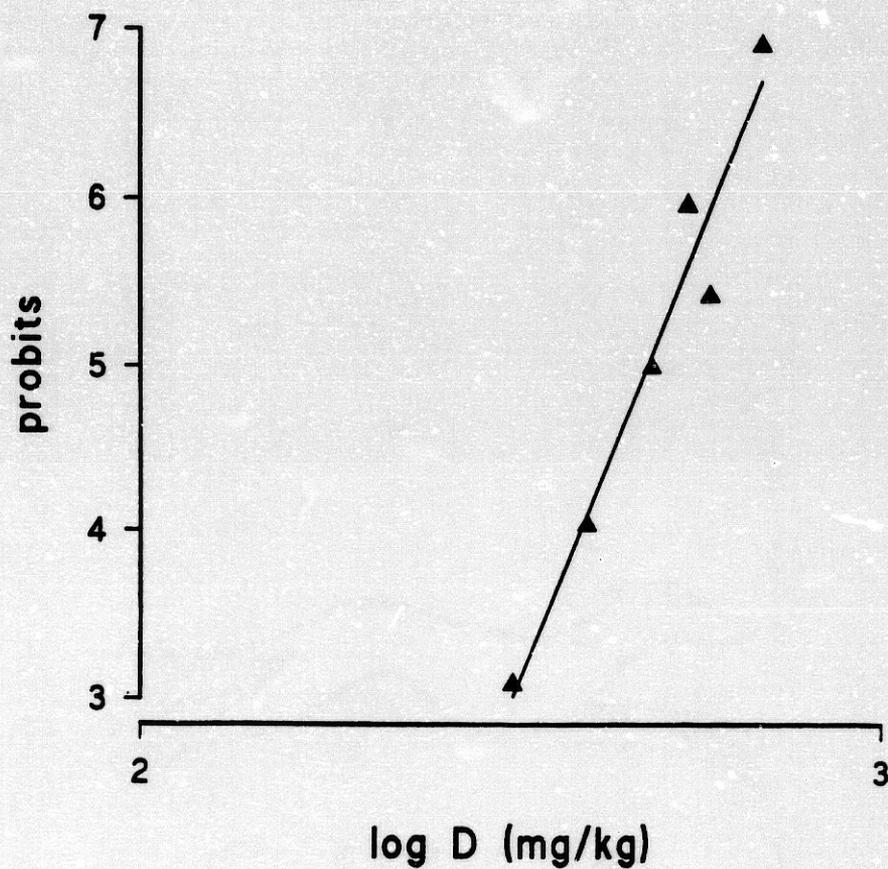


Figura 3: Cálculo de la dosis letal 50 (DL_{50}) de la FE. Abscisas: logaritmo de la dosis. Ordenadas: probits del % de mortalidad. Número de ratones utilizados $n=6$.

II. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

II.1. EFECTOS SOBRE SISTEMA CARDIOVASCULAR

II.1.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

II.1.1.a. Método cruento

La FE y la NAF producen un incremento dosis-dependiente de la presión, cuando se administran por vía intravenosa, a ratas normotensas (presión sistólica = 122.3 ± 6.2 mm Hg, n=4) (Figura 4). Los valores máximos obtenidos, expresados en incrementos porcentuales de presión sistólica, son de $71.5 \pm 4.3\%$ para $1000 \mu\text{g/kg}$ de FE y de $50.7 \pm 8.3\%$ para $5000 \mu\text{g/kg}$ de NAF. Las DE_{50} son $19.9 \pm 2.7 \mu\text{g/kg}$ y $331.5 \pm 12.4 \mu\text{g/kg}$, respectivamente.

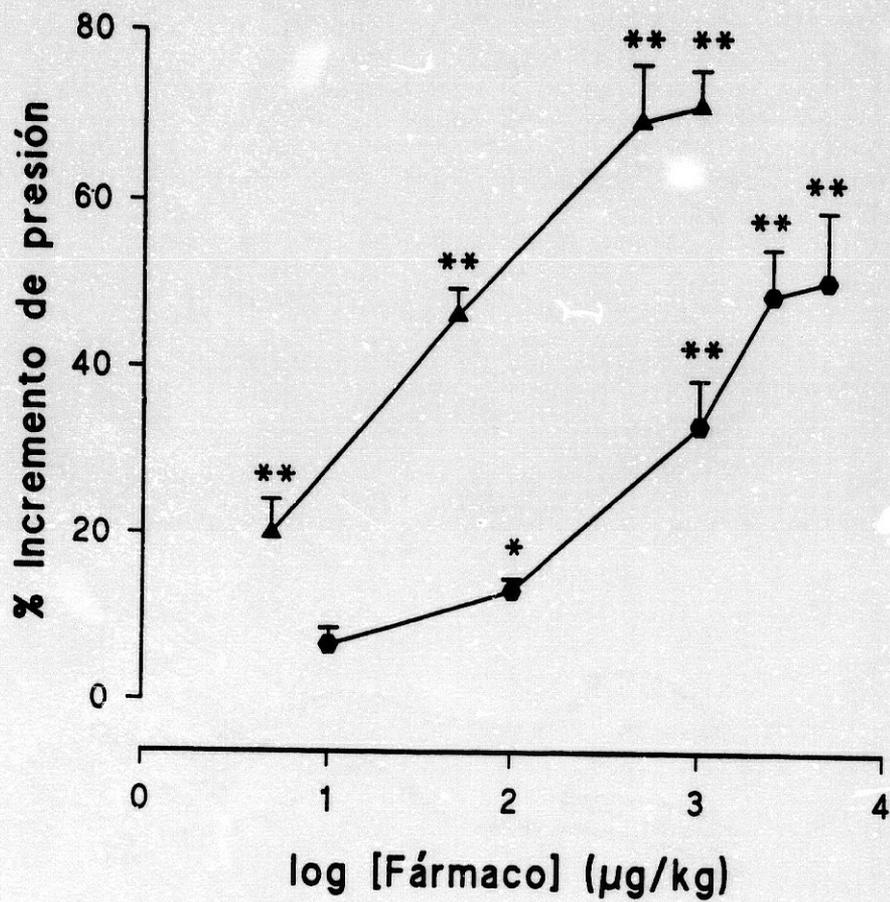


Figura 4: Efecto de FE (▲) y NAF (●), administradas intravenosamente, sobre la presión arterial de ratas normotensas. Abscisas: logaritmo de la concentración en µg/kg de fármaco. Ordenadas: incrementos porcentuales de presión arterial. La significación estadística se calcula entre los valores de presión arterial originada por cada dosis de fármaco en relación al valor de presión basal.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 4$)

II.1.1.b. Método incruento

Cuando se administran por vía oral FE (0.664 mg/kg) y NAF (83 mg/kg) aumentan la presión sistólica, en relación a su valor basal (129.2 ± 4.6 mm Hg); la dosis de 20 mg/kg de NAF carece de efecto. En el caso de la FE, sólo la dosis de 0.664 mg/kg produce un efecto significativo ($p < 0.05$), que aparece en la primera hora tras la administración, y que alcanza un valor máximo de $15.2 \pm 3.0\%$ en la segunda hora; este efecto tiende a desaparecer con el transcurso del tiempo (*Figura 5: a, b y c; figura 7*). La NAF, sin embargo, produce un $E_{\text{máx.}}$ ($13.7 \pm 2.8\%$) a la tercera hora de su administración (*Figura 6: a y b; figura 7*).

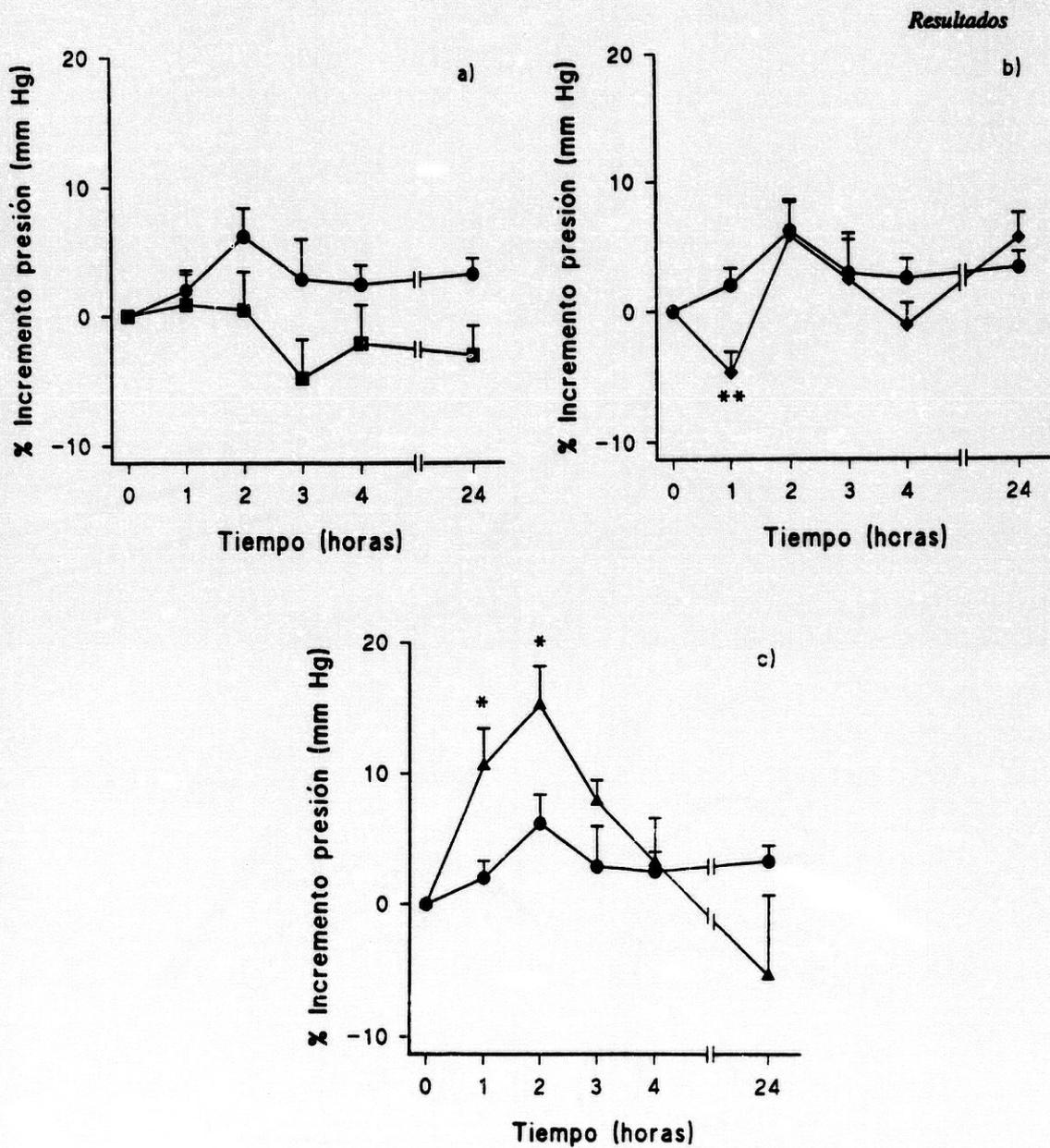


Figura 5: Representa los incrementos porcentuales de presión arterial (mm de Hg) en función del tiempo (h) transcurrido desde la administración oral. Las dosis utilizadas son 0.166 mg/kg (■, a), 0.332 mg/kg (◆, b), 0.664 mg/kg (▲, c) y vehículo (●, a, b y c). Cada punto es la media de 6 valores \pm SEM. La significancia estadística se realiza entre los valores de FE y de blanco. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

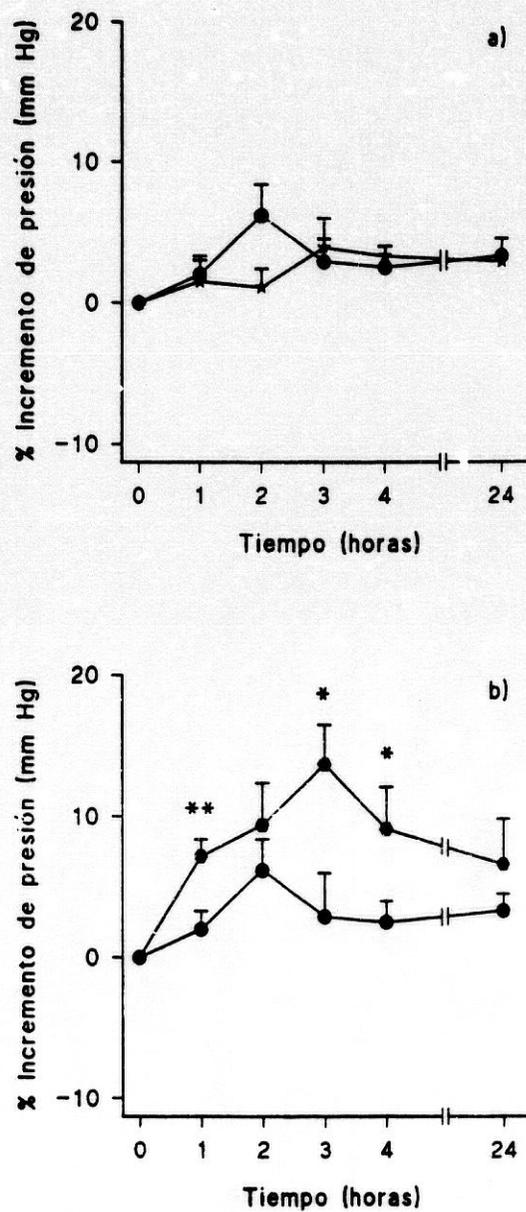


Figura 6: Representa los incrementos porcentuales de presión arterial (mm de Hg) en función del tiempo (h) transcurrido desde la administración oral. Las dosis utilizadas son 20 mg/kg (*, a), 83 mg/kg (●, b) y vehículo (●, a y b). Cada punto es la media de 6 valores \pm SEM. La significancia estadística se realiza entre los valores de NAF y de blanco. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

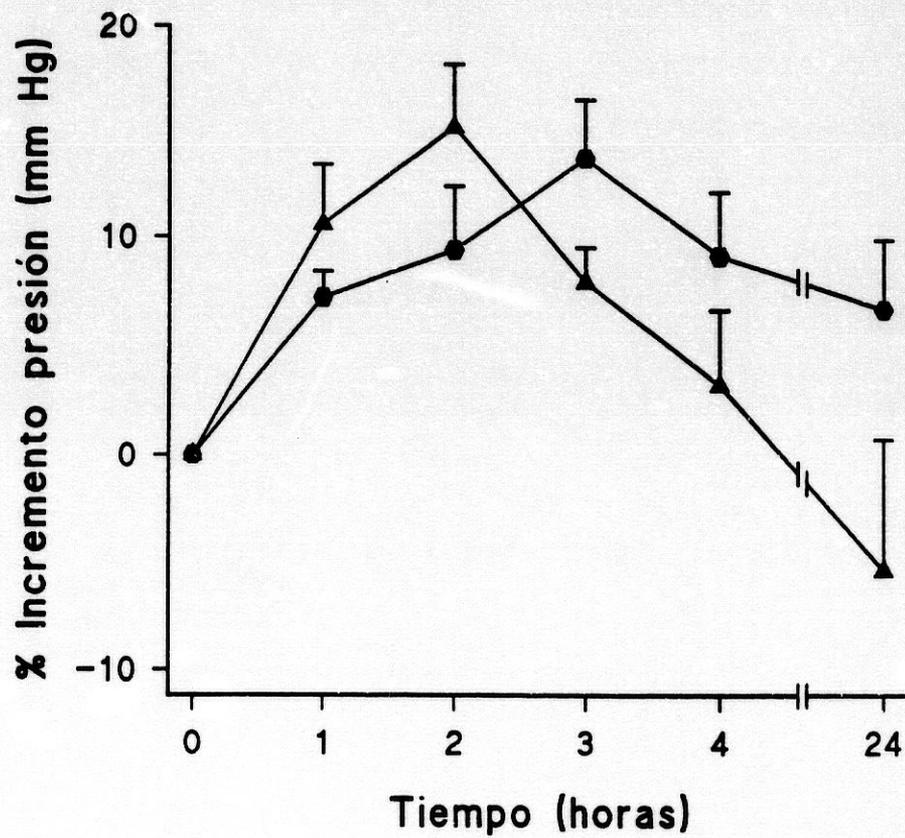


Figura 7: Comparación del efecto hipertensor originado por 0.664 mg/kg de FE (▲) y por 83 mg/kg de NAF (●).

II.1.2. EFECTOS SOBRE MÚSCULO LISO VASCULAR: AORTA AISLADA DE RATA

FE y NAF producen un efecto contractor sobre el músculo liso vascular (*Figura 8*). Los efectos máximos observados son 548.8 ± 98.3 mg (n=5) y 439.4 ± 29.7 mg (n=5), respectivamente. Los valores de pD_2 para ambos agonistas son de 7.3 ± 0.1 para FE, y de 5.1 ± 0.1 para NAF. Al comparar los valores de $E_{máx}$ y de pD_2 obtenidos con ambos compuestos, encontramos que existen diferencias significativas para $E_{máx}$, con $p < 0.05$, y para pD_2 , con $p < 0.01$.

Las contracciones provocadas por ambos agonistas se potencian cuando las preparaciones están desprovistas de endotelio (*Figura 9*). La relación entre el $E_{máx}$ alcanzado, en ausencia y en presencia de endotelio para la FE es de 2.0 ± 0.1 y 1.3 ± 0.1 para la NAF (n=5).

El efecto contractor inducido por concentraciones submáximas de FE (10^{-5} M) o de NAF (10^{-4} M) es inhibido por la presencia previa en el baño de concentraciones crecientes de verapamilo (10^{-8} - 10^{-5} M) (*Figura 10*). El $E_{máx}$ alcanzado es de $52.8 \pm 3.5\%$ y de $40.1 \pm 6.8\%$, frente a FE y NAF, respectivamente (n=5).

El prazosín (10^{-9} y 5×10^{-9} M) produce un desplazamiento hacia la derecha y hacia abajo de la curva concentración-respuesta obtenida tanto con FE como con NAF (n=5) (*Figura 11: a y b*).

Cuando se añade FE (10^{-5} M) o NAF (10^{-4} M) a 5 tiras de aorta incubadas en un medio KS libre de calcio y con 2 mM de EDTA, se produce una

contracción fásica que alcanza valores máximos (142.9 ± 22.7 mg y 86.5 ± 28.5 mg, respectivamente) a los 20 s de estar en contacto con la preparación (*Figura 12*).

La ACh (10^{-5} M) relaja las tiras de aorta ($n=5$) previamente contraídas con FE (10^{-5} M) o NAF (10^{-4} M), si bien en el caso de la NAF esta relajación es algo más acentuada (*Figura 13*).

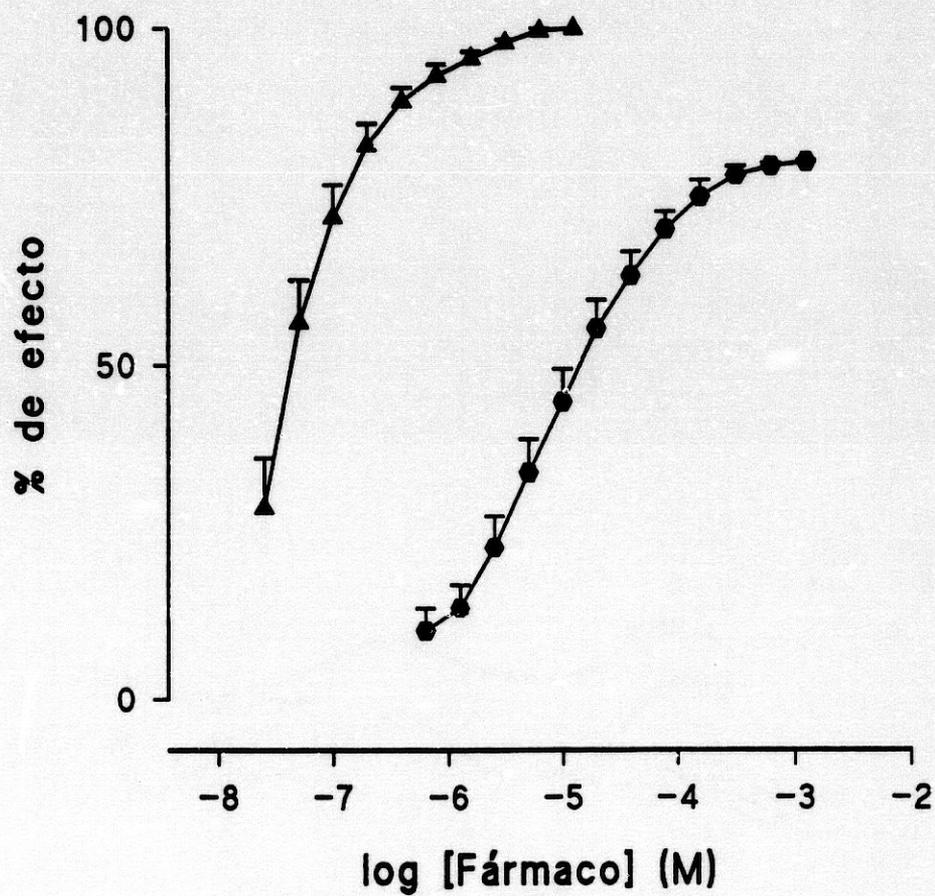


Figura 8: Efecto de la FE (▲) y de la NAF (●) sobre el músculo liso vascular. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto contractor. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM.

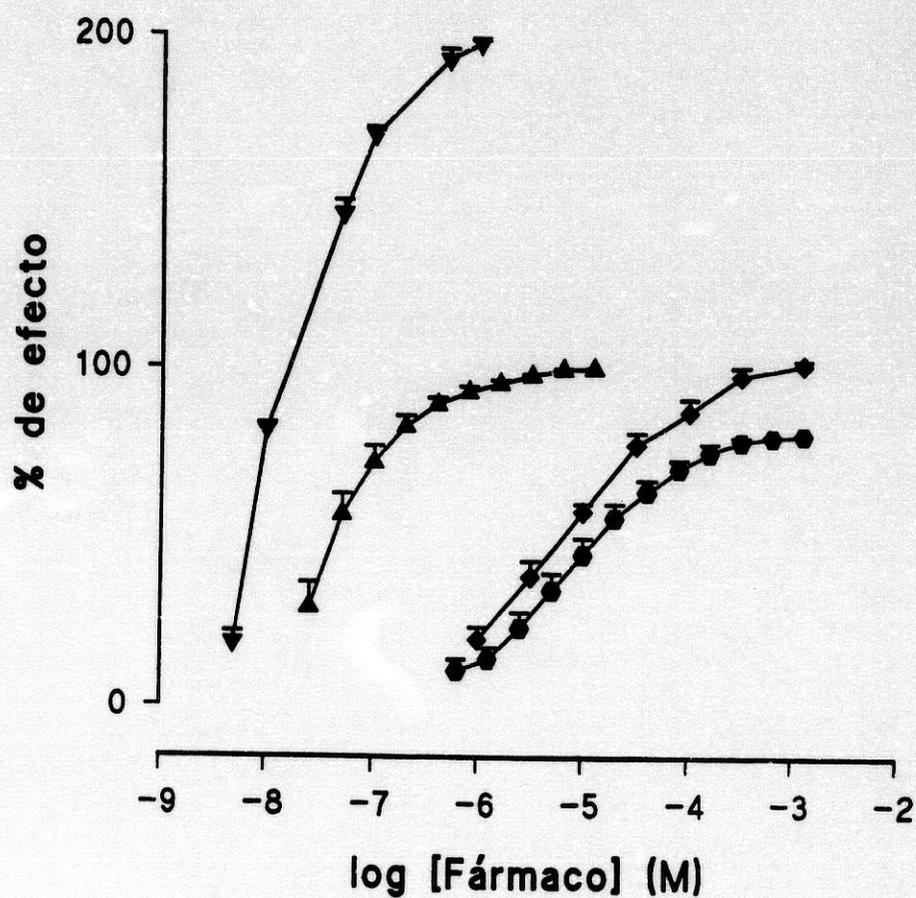


Figura 9: Efecto de la FE (▲, ▼) y la NAF (●, ◆) sobre aortas de rata con y sin endotelio respectivamente. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto contractor. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM.

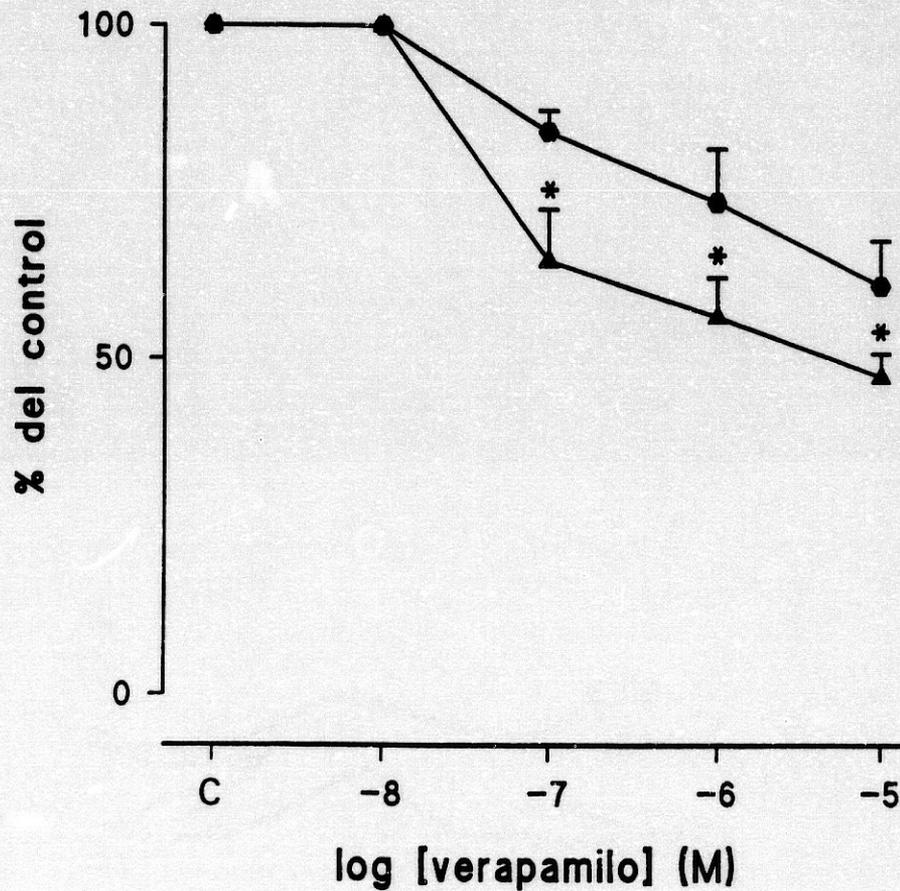


Figura 10: Efecto del verapamilo sobre las contracciones inducidas por FE (▲) o NAF (●) en aorta aislada de rata. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de verapamilo. Ordenadas: % de efecto en relación al valor control. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los efectos producidos por una misma concentración de verapamilo frente a las contracciones originadas por FE o por NAF. * $p < 0.05$.

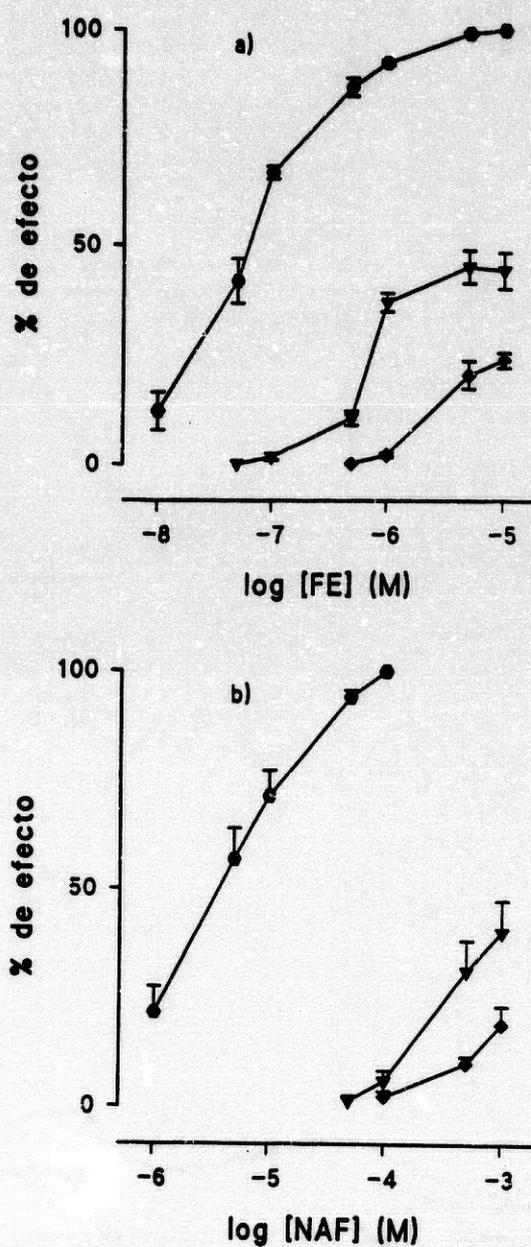


Figura 11: Curva concentración-respuesta de la FE (a) y de la NAF (b) en ausencia (●) y en presencia de 10^{-9} M (▼) y 5×10^{-9} M (◆) de prazosín, en aorta aislada de rata. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM.

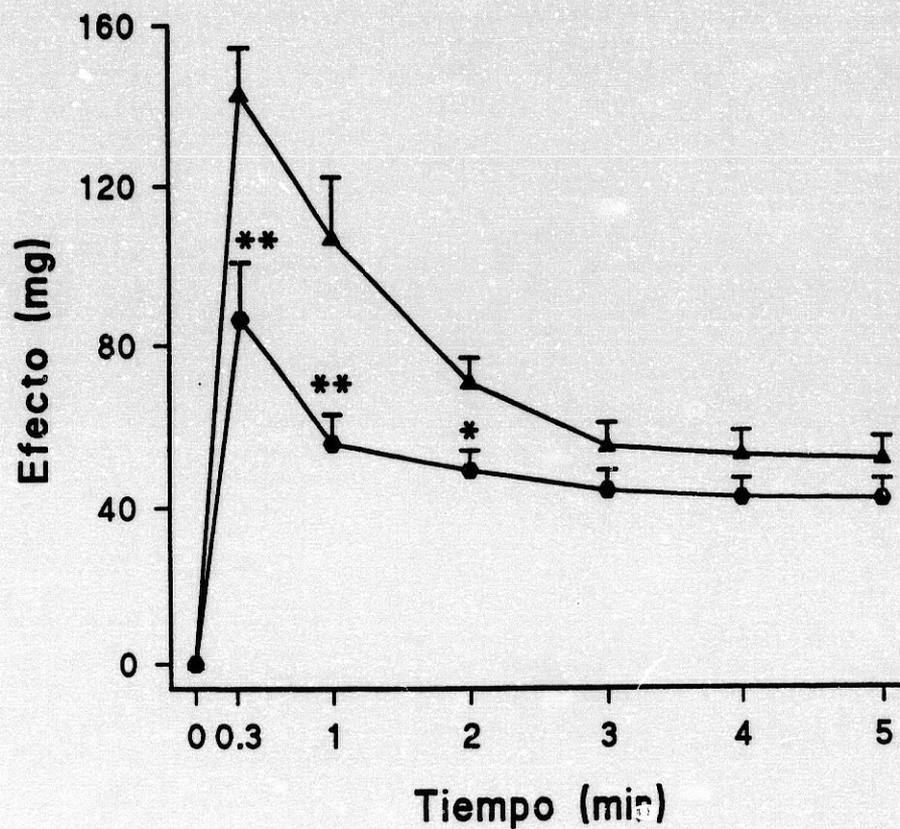


Figura 12: Contracciones fásicas originadas por FE (▲) o NAF (●) sobre aortas aisladas de rata incubadas en un medio libre de calcio. Abscisas: tiempo transcurrido desde la adición de los fármacos. Ordenadas: efecto en mg de fuerza. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los efectos producidos por la FE o la NAF a igual tiempo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

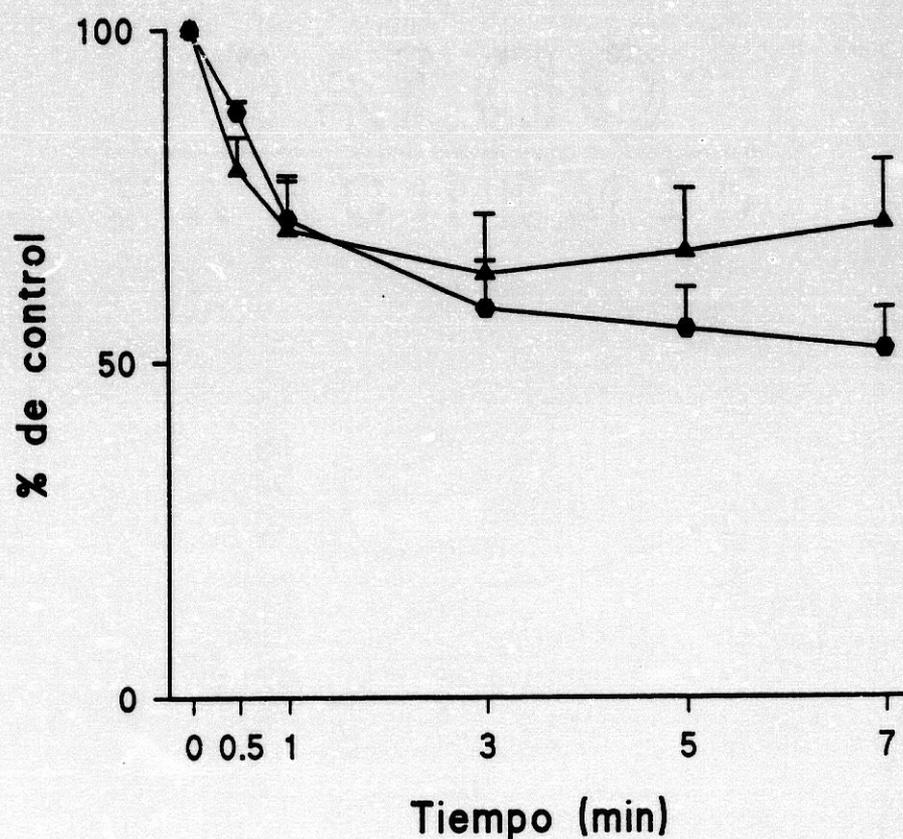


Figura 13: Efecto relajante de la ACh (10^{-5} M) sobre las contracciones producidas por 10^{-5} M FE (\blacktriangle) o 10^{-4} M NAF (\bullet) en aorta aislada de rata. Abscisas: tiempo (min) transcurrido después de la adición de ACh. Ordenadas: % de efecto en relación al control. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los efectos producidos por la ACh a igual tiempo.

II.1.3. EFECTOS SOBRE EL MÚSCULO CARDIACO: AURÍCULA AISLADA DE COBAYA

II.1.3.a. Aurícula derecha

La FE origina un aumento concentración-dependiente tanto de la frecuencia como de la fuerza de contracción de la aurícula derecha de cobaya (*Figura 14: a y b*). Con la concentración de 10^{-4} M se consigue aumentar la frecuencia un $44.5 \pm 6.8\%$ en relación a la basal (205 ± 10.4 lpm, $n=5$). Su DE_{50} es de 6.5×10^{-6} M. El incremento máximo en la fuerza de contracción auricular se consigue también con 10^{-4} M, y supone un $105.5 \pm 16.0\%$ respecto al control (238.2 ± 27.8 mg, $n=5$). Su DE_{50} es de 2.3×10^{-5} M.

La NAF (*Figura 14: a y b*) produce una moderada disminución concentración-dependiente de la fuerza de contracción, alcanzando su valor máximo a 10^{-4} M ($24.3 \pm 8.9\%$). No afecta de manera significativa la frecuencia (200.0 ± 20.0 lpm del control v.s. 195.4 ± 4.3 lpm, a la concentración de 10^{-4} M de NAF, $p>0.05$).

II.1.3.b. Aurícula izquierda

La FE produce un incremento concentración-dependiente de la fuerza de contracción de 6 aurículas izquierdas estimuladas eléctricamente. El efecto máximo obtenido con la concentración de 10^{-4} M es de $267.5 \pm 40.4\%$ (control: 310.1 ± 9.9 mg) y su DE_{50} es de 3.3×10^{-5} M. Sin embargo, la NAF disminuye este parámetro de forma significativa, llegando a reducir un $47.5 \pm 2.5\%$ el valor control (325.0 ± 27.1 mg, $n=6$) (*Figura 15*).

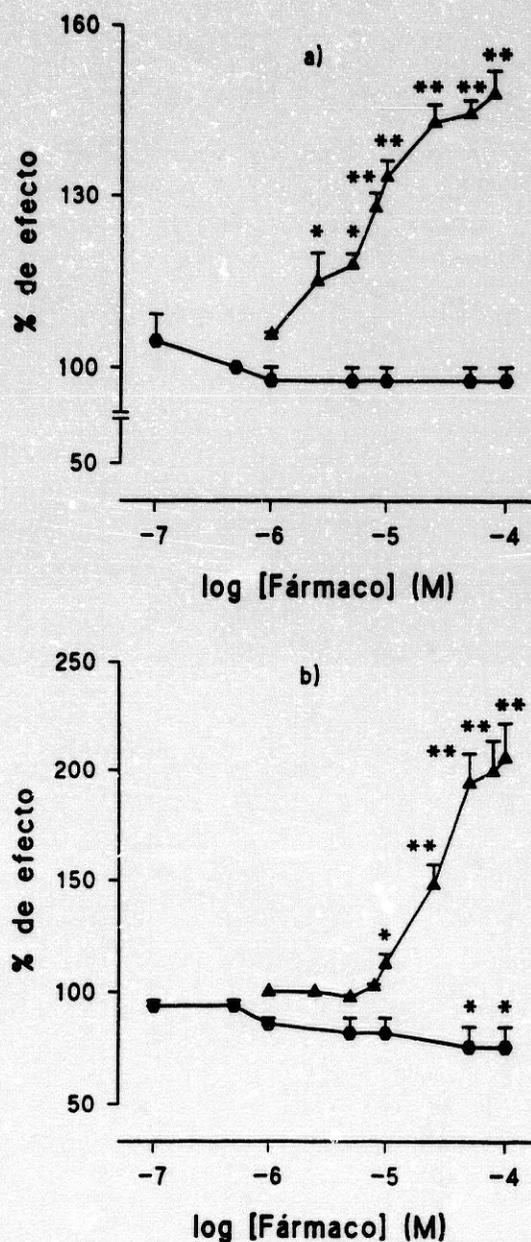
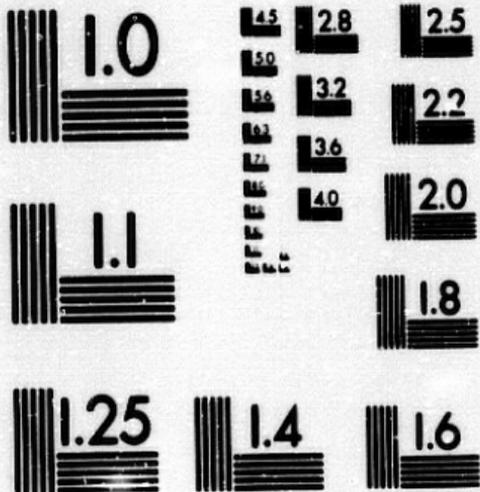


Figura 14: Efecto de la FE (▲) y la NAF (●) sobre la frecuencia (a) y la fuerza de contracción (b) de aurículas derechas de cobaya. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto en relación al control. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los valores obtenidos con cada fármaco frente a los valores control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

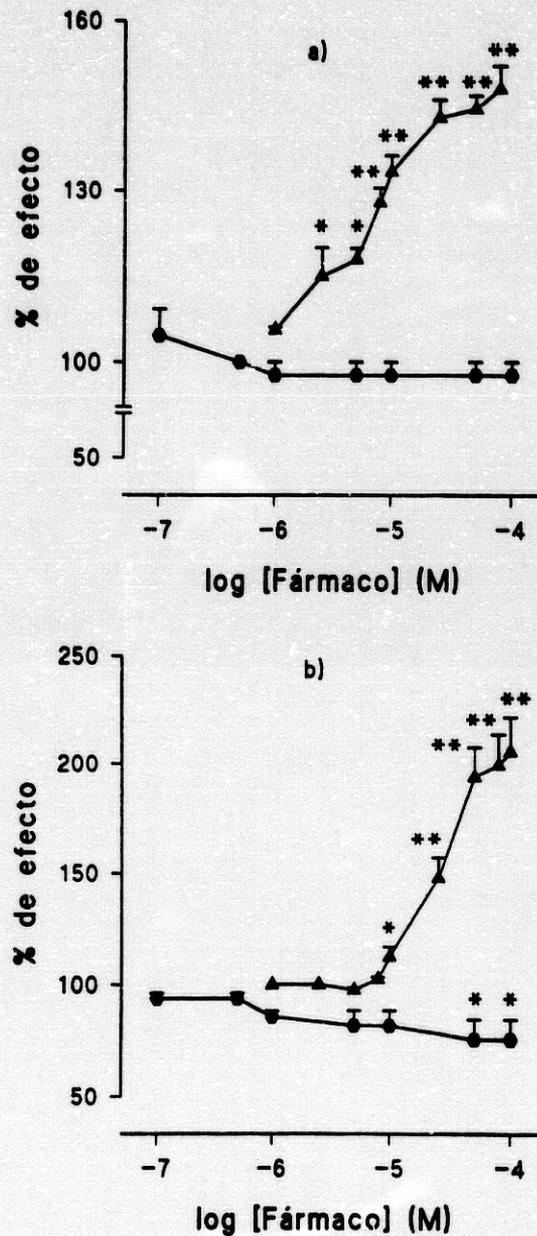


Figura 14: Efecto de la FE (▲) y la NAF (●) sobre la frecuencia (a) y la fuerza de contracción (b) de aurículas derechas de cobaya. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto en relación al control. Cada punto representa la media de 5 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los valores obtenidos con cada fármaco frente a los valores control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

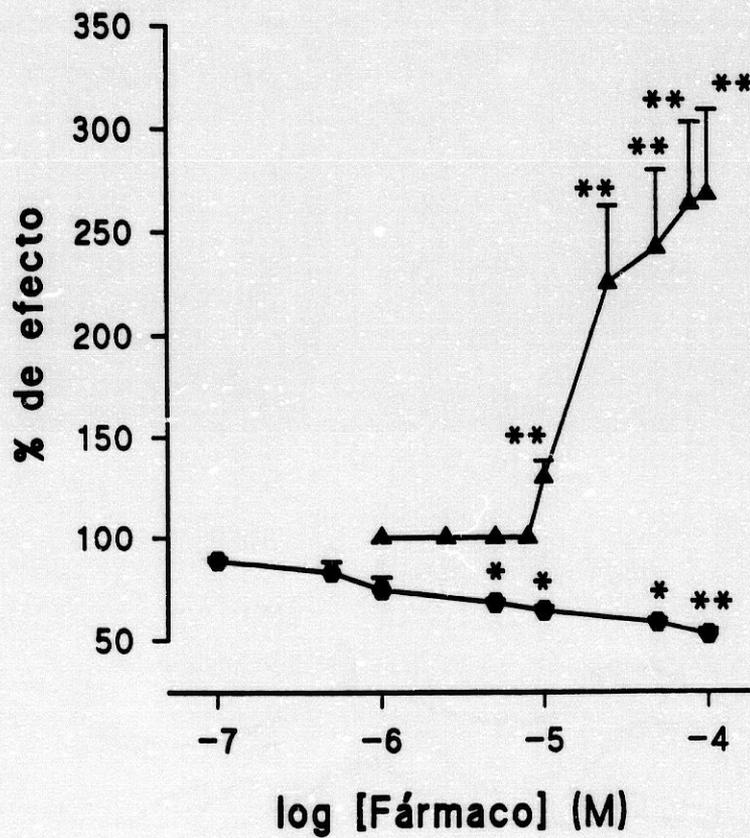


Figura 15: Efecto de la FE (▲) y la NAF (●) sobre la fuerza de contracción de aurículas izquierdas de cobaya. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto en relación al control. Cada punto representa la media de 6 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los valores obtenidos con cada fármaco frente a los valores control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

II.2. EFECTOS A OTROS NIVELES

II.2.1. EFECTOS SOBRE SNC

II.2.1.a. Test de la curiosidad

La FE origina una disminución significativa ($p < 0.01$) de la curiosidad en relación al blanco cuando se administra a concentraciones superiores a 8 mg/kg. Este efecto comienza a hacerse evidente a partir de los 30 min de su administración, y aumenta con el transcurso del tiempo (*Figuras 16 y 17*).

La NAF, 1000 mg/kg, no disminuye de forma significativa el número de orificios explorados desde los 30 minutos de su administración (*Figuras 16 y 17*; $p > 0.05$).

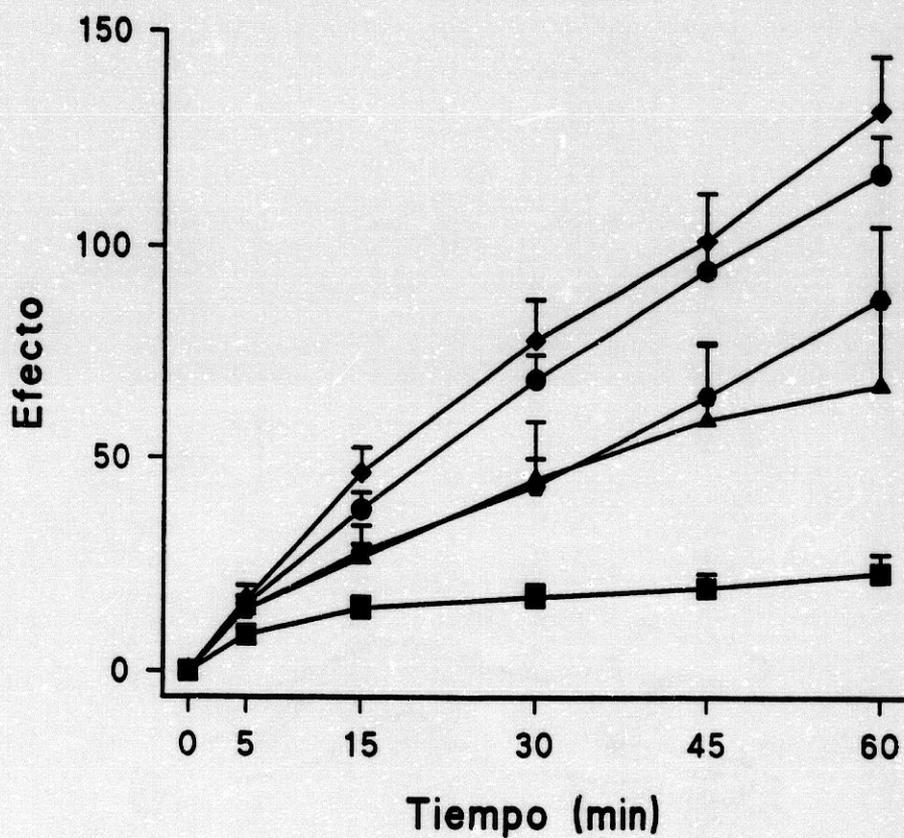


Figura 16: Test de la curiosidad para dosis de 4 mg/kg (◆), 8 mg/kg (▲) y 16 mg/kg (■) de FE, 1000 mg/kg (●) de NAF y para el blanco (●). Abscisas: tiempo transcurrido desde la administración en minutos. Ordenadas: media acumulada de orificios explorados. Cada punto representa la media de 6 experiencias \pm SEM.

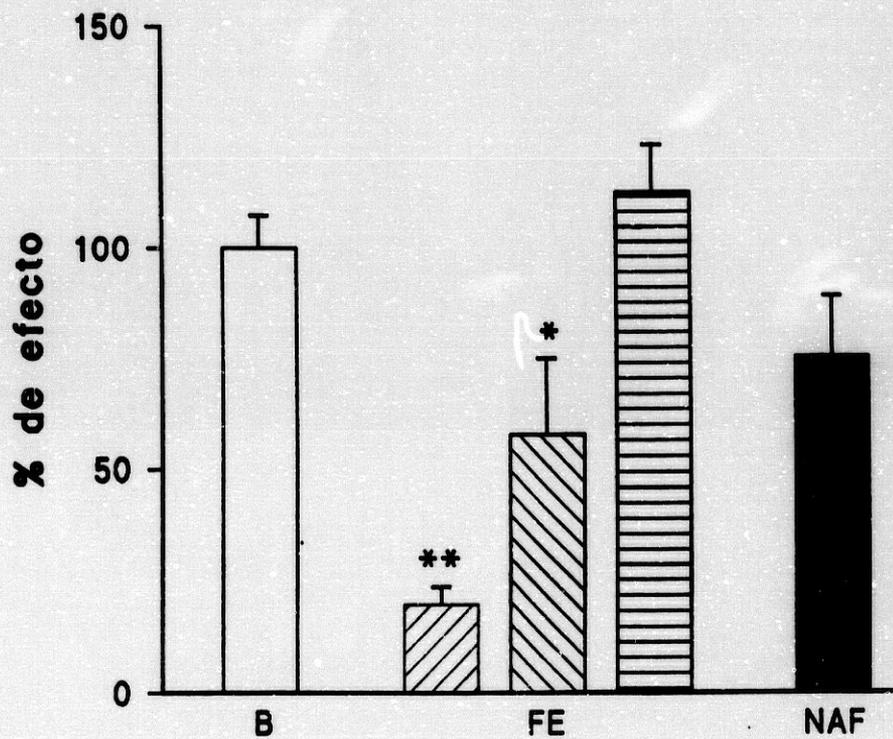


Figura 17: Número de orificios explorados acumulados a los 60 minutos, en relación al blanco (B, \square), producidos por 16 mg/kg (\square), 8 mg/kg (\square) y 4 mg/kg (\square) de FE y 1000 mg/kg (\blacksquare) de NAF. Cada columna representa el valor de la media de 6 experiencias \pm SEM. La significación estadística se calcula entre los valores obtenidos para cada dosis y el blanco.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

II.2.1.b. Determinación de la actividad motora

Cuando se administran distintas dosis de FE, 32, 16 y 4 mg/kg, a lotes de 5 animales, se produce una disminución significativa ($p < 0.01$) de la motilidad desde la primera hora de medida, en relación con el lote blanco. Este efecto inhibitor de la FE desaparece a las 9 horas de la administración, en el caso de la dosis de 4 mg/kg, pero se mantiene durante el tiempo que dura la experiencia en las dosis de 16 y 32 mg/kg.

La NAF, 1000 mg/kg, también disminuye significativamente la actividad motora ($p < 0.01$) (*Figura 18*).

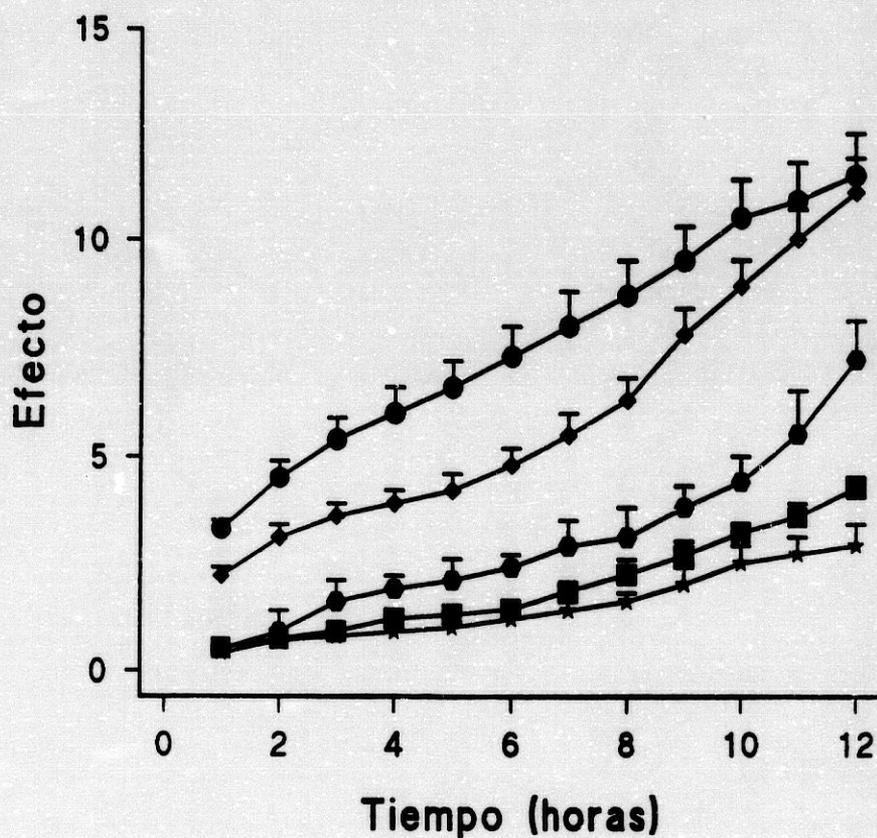


Figura 18: Modificación de la actividad motora originada por 4 mg/kg (◆), 16 mg/kg (■) y 32 mg/kg (✱) de FE, 1000 mg/kg (●) de NAF y por el blanco (●). Abscisas: tiempo transcurrido desde la administración en horas. Ordenadas: movimientos acumulados $\times 10^3$. Cada punto representa la media de 10 experiencias \pm SEM.

II.2.1.c. Modificación del tiempo de sueño barbitúrico

El comportamiento de la FE como modificador de la duración del sueño inducido por pentobarbital, varía en función de la dosis administrada. Así las dosis de 4 y 8 mg/kg acortan el tiempo de sueño ($71.4 \pm 5.9\%$ y $37.3 \pm 9.5\%$, respectivamente) ($n=6$, $p<0.01$), mientras que la dosis de 16 mg/kg produce un aumento del valor de este parámetro ($34.5 \pm 18.4\%$) ($n=6$, $p<0.05$). Sin embargo la dosis de 1000 mg/kg de NAF no altera significativamente la duración del sueño (blanco, 132.3 ± 10.4 min. v.s. NAF, 137.3 ± 27.4 ; $n=6$; $p>0.05$)(Figura 19).

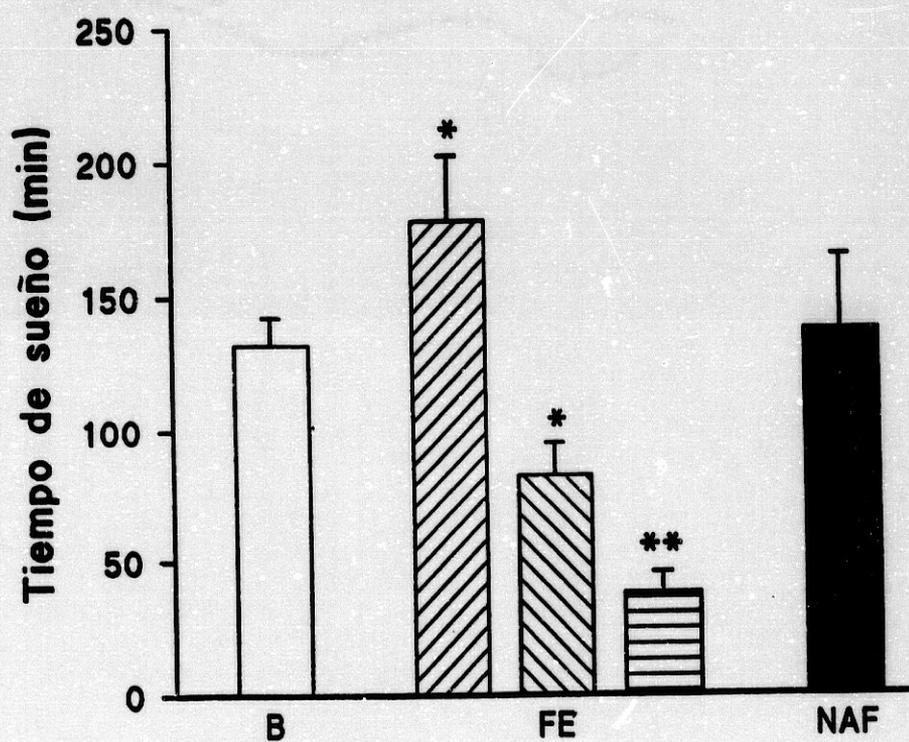


Figura 19: Modificación del tiempo de sueño barbitúrico originada por 4 mg/kg (▨), 8 mg/kg (▧) y 16 mg/kg (▩) de FE, 1000 mg/kg (■) de NAF y por el blanco (B, □). Ordenadas: tiempo de sueño en minutos (n=6); * p< 0.05, ** p< 0.01.

II.2.2. EFECTOS SOBRE MÚSCULO LISO TRAQUEAL: TRÁQUEA AISLADA DE COBAYA

Cuando se añade FE (10^{-5} - 1.3×10^{-2} M) a tráqueas previamente contraídas con ACh (control = 403.3 ± 48.0 mg, n=6), se observa un doble comportamiento en relación con la concentración. Hasta 10^{-4} M, la FE relaja de forma concentración-dependiente la tráquea, consiguiéndose un efecto del $34.3 \pm 8.8\%$ respecto al control; pero al aumentar la concentración, pierde la capacidad relajante y produce un efecto contractor. Sin embargo, la NAF relaja totalmente la contracción preexistente (control = 428.4 ± 30.7 mg, n=5), obteniéndose un valor de IC_{50} de 129.5 ± 21.8 mM (*Figura 20*).

La presencia de propranolol (2×10^{-5} M), desplaza hacia la derecha la curva concentración-respuesta del NAF ($IC_{50} = 288.7 \pm 57.3$ mM, n=4, $p < 0.01$) (*Figura 21*).

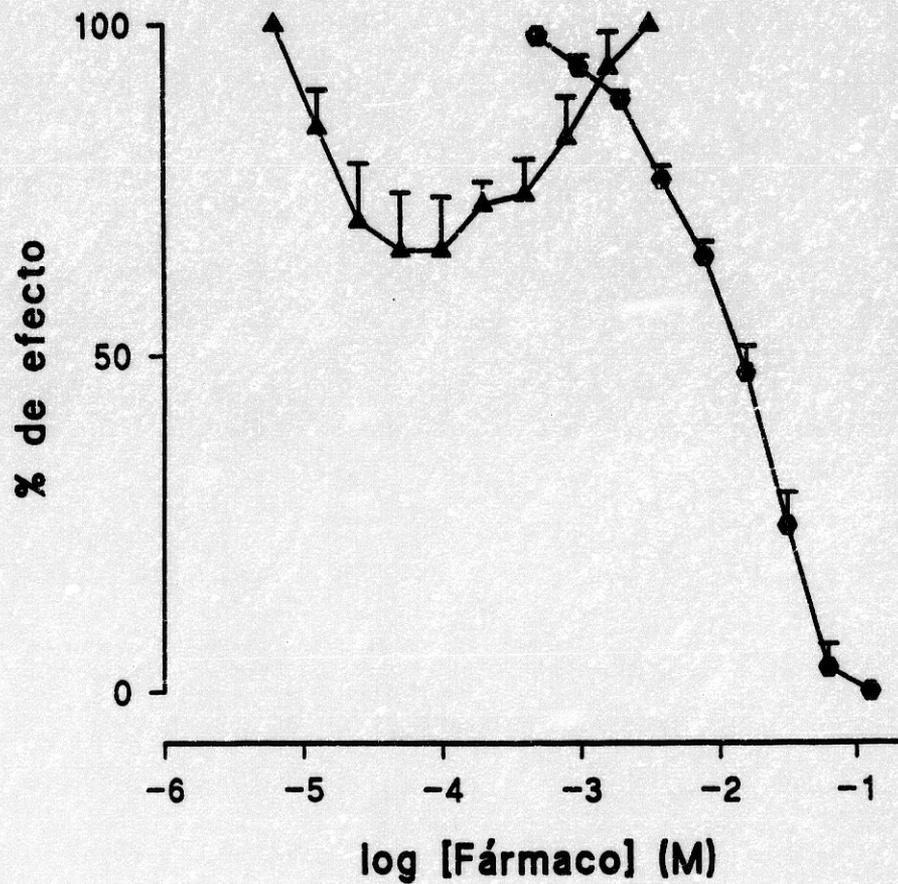


Figura 20: Efecto de la FE (▲) y de la NAF (●) sobre la tráquea aislada de cobaya. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto relajante o contráctil. Cada punto representa la media de 5 (NAF) ó 6 (FE) experiencias \pm SEM

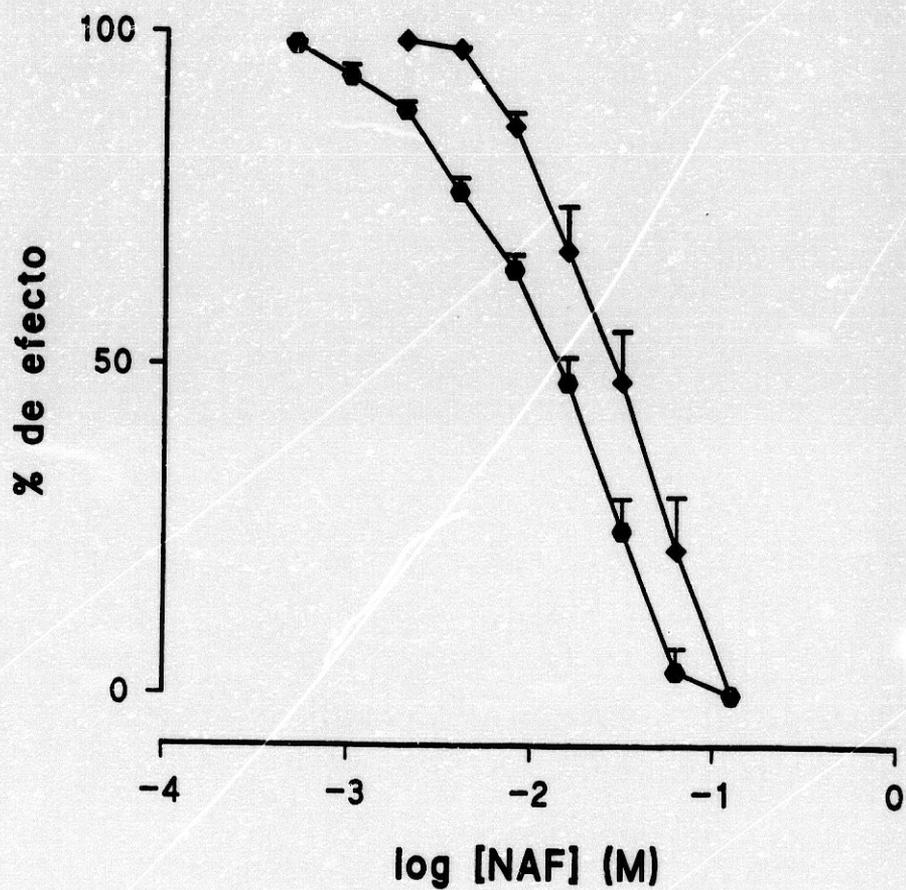


Figura 21: Curva concentración-respuesta de la NAF en ausencia (●) y en presencia (◆) de 2×10^{-5} M de propranolol, en tráquea aislada de cobaya. Cada punto representa la media de 4 experiencias \pm SEM.

II.2.3. EFECTOS SOBRE EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

FE y NAF contraen de forma concentración-dependiente el músculo liso del conducto deferente de rata (*Figura 22*). Los efectos máximos observados son de 1022.3 ± 51.0 mg (n=4) y 677.0 ± 47.4 mg (n=4), respectivamente. Los valores de pD_2 para ambos agonistas son de 5.0 ± 0.1 y 2.6 ± 0.2 , respectivamente.

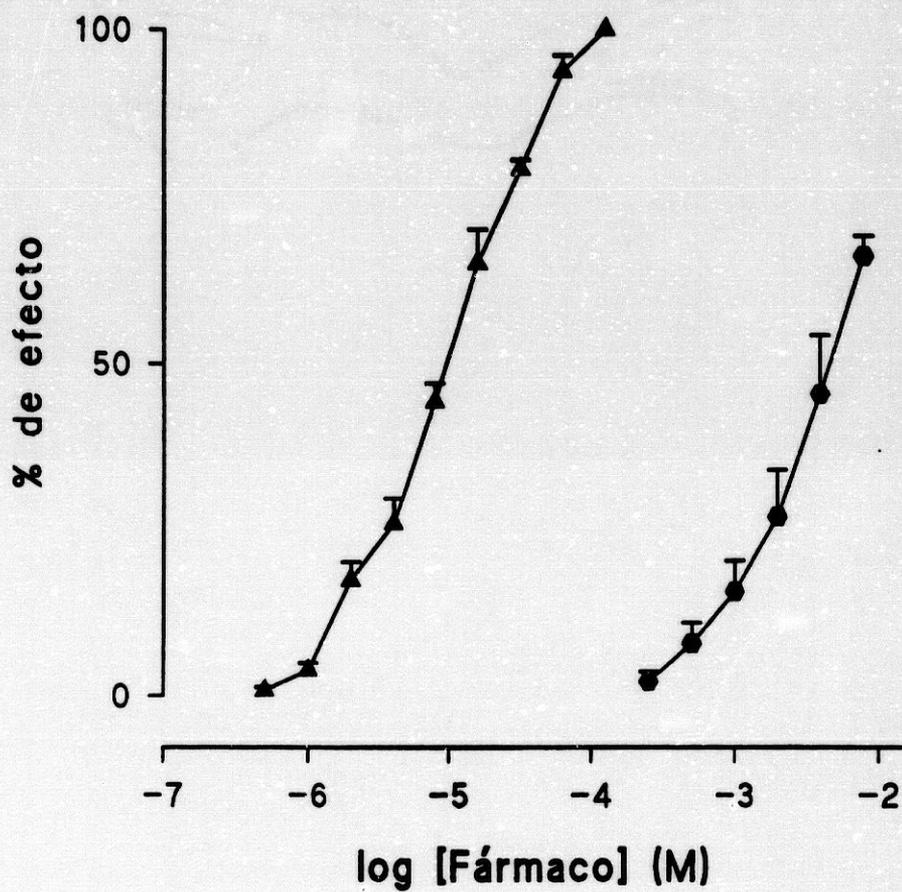


Figura 22: Efecto de la FE (▲) y de la NAF (●) sobre el músculo liso de conducto deferente de rata. Abscisas: logaritmo de la concentración molar de fármaco. Ordenadas: % de efecto contractor. Cada punto es la media de 4 experiencias \pm SEM.

DISCUSIÓN

El objeto de esta tesis es estudiar el perfil farmacológico de la NAF, fármaco suministrado por el Departamento de Química Física de esta Universidad. Este estudio lo hemos realizado comparando su perfil con la FE, que utilizamos como fármaco patrón. La actuación fundamental se ha centrado en el estudio a nivel cardiovascular, no obstante se aportan datos sobre la actuación a otros niveles, que nos indiquen posibles diferencias de comportamiento de ambos fármacos.

I. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

En este apartado hemos pretendido estudiar la DL_{50} de FE y NAF con una doble finalidad:

- Determinar las diferencias de toxicidad entre ambos.
- Seleccionar las dosis para experiencias en animal entero.

La DL_{50} de la FE en ratón, administrada intraperitonealmente, ha sido de 490.2 ± 24.0 mg/kg. Sin embargo, en el caso de la NAF no fue posible determinar su toxicidad, aunque ésta debe ser superior a 1000 mg/kg, dosis que no produce la muerte de ningún animal. Estos hechos están de acuerdo con lo indicado por Marvola (1976), quien tampoco pudo determinar la DL_{50} de este fármaco, aunque señala que es sustancialmente más elevada que la calculada para la FE.

Estos resultados nos llevan a pensar que podemos utilizar dosis de este fármaco muy superiores a las usadas para FE.

II. EFECTOS A NIVEL CARDIOVASCULAR

II.1. PRESIÓN ARTERIAL

La NAF produce una acción hipertensora al ser administrada por vía intravenosa, que es significativa a partir de la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, alcanzando su $E_{\text{máx}}$ con 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El comportamiento hipertensor de este compuesto es similar al de la FE, si bien se muestra mucho menos potente (16.6 veces) y menos activa (1.5 veces).

Cuando la NAF se administra oralmente produce unos incrementos significativos en la presión arterial a la dosis de 83 mg/kg , alcanzando su máximo a las 3 horas de la administración. Al comparar este comportamiento con el manifestado por la FE se observan ciertas diferencias, tanto en la dosis activa (125 veces mayor para el derivado acetilado), como en el momento de máxima actividad, que se retrasa para la NAF en 1 hora.

Al relacionar las modificaciones de presión arterial en ambos modelos experimentales, observamos que las diferencias de potencia entre ambos fármacos son más acentuadas cuando se administran por vía oral que en el caso de la vía intravenosa. Esto nos puede llevar a pensar que éstas se deban a la participación de procesos farmacocinéticos, que dificulten la llegada al lugar activo del derivado acetilado.

El efecto hipertensor presentado por estos compuestos puede ser debido fundamentalmente a una actuación sobre la resistencia vascular o bien sobre

el gasto cardiaco. Por ello, nuestros estudios se han dirigido a poner de manifiesto su actuación a estos niveles.

II.2. SOBRE MÚSCULO LISO VASCULAR

La NAF posee un efecto vasoconstrictor en aorta de rata concentración-dependiente ($r=0.99$), efecto que se incrementa sólo 1.3 veces al eliminar el endotelio. Este efecto vasoconstrictor tiene un doble comportamiento, fásico y tónico, siendo este último bloqueado parcialmente por el verapamilo, antagonista de canales de calcio. El efecto contráctil es antagonizado por el prazosín, bloqueante de receptores α_1 , desplazando las curvas concentración-efecto hacia la derecha y abajo.

Al comparar el comportamiento vasoconstrictor de la NAF con la FE, fármaco patrón agonista α_1 (Langer, 1974; Ruffolo y cols., 1976), podemos resaltar los siguientes hechos:

- La NAF presenta una menor potencia (158 veces) y una menor actividad (1.25 veces) que la FE. Cuando se elimina el endotelio el efecto vasoconstrictor de la NAF se afecta en menor medida que en el caso de la FE.

- Cuando se añade un agonista α_1 a un medio libre de calcio con 2 mM de EDTA, se produce una contracción fásica, que es debida a la movilización de calcio liberado del retículo sarcoplasmático (Godfraind y cols., 1986); en estas condiciones la contracción producida por la NAF es significativamente menor a la

producida por FE, lo cual indica su menor capacidad para movilizar calcio intracelular.

- La contracción tónica producida por FE y NAF es bloqueada por un antagonista del calcio como el verapamilo, si bien se encuentra menos afectada la NAF que la FE. Esto nos lleva a pensar que en este componente de la contracción, la entrada de calcio extracelular tenga menor influencia para la NAF que para la FE.

- El prazosín bloquea las curvas concentración-efecto cualitativamente de forma similar en la NAF y en la FE; este hecho nos da idea de la posible afinidad del NAF por receptores α_1 en aorta de rata.

- Es conocido que en aorta de rata existen subtipos de receptores α_1 , α_{1a} y α_{1b} , (Minneman, 1988; Minneman y cols., 1988). Una manera indirecta para poner de manifiesto la unión de los fármacos a estos subtipos es la indicada por Auguet y cols. (1992), basada en la diferente capacidad relajante del FRDE (factor relajante dependiente del endotelio) frente a la contracción provocada por diferentes agonistas α_1 . La ACh, fármaco que actúa liberando el FRDE (Furchgott y Zawadzki, 1980), afecta en mayor medida a la contracción producida por NAF que a la producida por FE, lo que puede ser indicativo de una mayor selectividad por el subtipo α_{1b} .

El efecto contractor del derivado acetilado es bastante similar al observado para la FE, agonista α_1 , con un componente fásico debido a liberación de calcio intracelular, y un componente tónico, resultado de la entrada de calcio desde el medio extracelular. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al comportamiento

de estos fármacos, diferencias que podrían explicarse por la selectividad por distintos subtipos de este receptor, capaces de poner en juego diversos mecanismos moleculares. En este sentido hay que señalar que el efecto es menos sensible a bloqueo por antagonistas del calcio, lo que estaría en acuerdo con una mayor selectividad por el subtipo α_{1b} , según la hipótesis de Minneman (1988), hecho ratificado por las experiencias indirectas con ACh. No obstante, no podemos concluir de manera tajante, puesto que no se han realizado experimentos de *binding* ni experimentos con bloqueantes selectivos de este subtipo de receptor.

II.3. SOBRE EL MÚSCULO CARDIACO

La NAF produce una leve acción cardíaca, caracterizada por una disminución en la fuerza de contracción tanto de la aurícula derecha como de la izquierda de cobaya, y por una ausencia de actividad sobre la frecuencia. Tales efectos están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Marvola y cols., 1977). Por el contrario la FE es capaz de incrementar de forma concentración-dependiente ambos parámetros en el tejido auricular, si bien la frecuencia se modifica con concentraciones inferiores (28 veces) que la fuerza.

Este efecto inotrópico y cronotrópico positivo originado por la FE ha sido atribuido a su capacidad de estimular receptores α_1 cardíacos, y a la consiguiente movilización de fosfoinosítidos (Kushida y cols., 1988; Otani, 1988; Otani y cols., 1988; Scholz y cols., 1988). Por tanto, la variación de actividad cardíaca producida por la NAF nos haría pensar en una pérdida de afinidad por los receptores α_1 . Sin embargo, existen datos experimentales que indican que otros agonistas selectivos por este tipo de receptores como la metoxamina (Satoh y

Hashimoto, 1988; Ask y cols., 1987; Duarte y cols. 1990) son capaces de disminuir ligeramente la fuerza de contracción y modificar muy poco la frecuencia auricular.

Estas diferencias existentes entre el comportamiento de estos fármacos podrían ser explicadas por la existencia de alguna subpoblación de receptores α_1 a nivel cardiaco, aunque no existen datos concluyentes que confirmen esta hipótesis. Las diferencias encontradas entre los efectos producidos por FE y NAF sólo podrán ser explicadas mediante la utilización de antagonistas selectivos de estos subtipos de receptores y la realización de estudios electrofisiológicos.

Al comparar la potencia de la NAF en el territorio vascular y cardiaco se observa que, sin tener en cuenta las diferencias entre especies (rata y cobaya), existe selectividad por el músculo liso vascular, lo que hace pensar que la acción hipertensora provocada por este fármaco se debe fundamentalmente a un efecto aumentador de la resistencia periférica.

III. EFECTOS A OTROS NIVELES

III.1. SOBRE SNC

La NAF a la dosis de 1000 mg/kg, dosis que no produce signos de toxicidad aguda, es capaz de disminuir significativamente la actividad motora, mientras que no afecta al tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico, ni a la capacidad exploradora de ratones. Este perfil puede ser indicativo de una ligera actividad depresora sobre el SNC. Sin embargo los efectos centrales aparecen a dosis

muy alejadas (12.5 veces) de las necesarias para originar actuación a nivel cardiovascular.

La FE, fármaco utilizado como patrón, presenta un perfil de actuación sobre el SNC que difiere parcialmente del presentado por la NAF. A dosis de 4 mg/kg únicamente disminuye la duración del tiempo de sueño barbitúrico; a partir de dosis de 16 mg/kg presenta un perfil depresor del SNC, disminuyendo significativamente la curiosidad de los animales, su actividad motora y potenciando el tiempo de sueño.

Al comparar los resultados obtenidos por ambos fármacos en esta batería de técnicas, hay que resaltar la mayor potencia depresora de la FE, que podría ser explicada por su mayor afinidad por los receptores α centrales, de manera análoga a lo que ocurre en territorios periféricos (músculo liso vascular). En este sentido podríamos comentar que la relación existente entre las dosis activas de NAF y de FE a nivel del SNC es de 125, muy similar a la existente entre estos compuestos cuando se determina la presión arterial, tras una administración oral.

III.2. SOBRE MÚSCULO LISO TRAQUEAL

La NAF relaja de forma concentración-dependiente la tráquea aislada de cobaya que ha sido previamente contraída con ACh, aunque a dosis 10000 veces superiores a las necesarias para mostrar sus efectos vasoconstrictores. Este efecto se antagoniza por propranolol; por tanto, se puede pensar que su actividad relajante sea debida a una posible estimulación de los receptores β traqueales.

Por otro lado, la FE también inhibe la contracción originada por ACh, pero a concentraciones aproximadamente 200 veces inferiores que la NAF. Sin embargo, a partir de concentraciones superiores a 10^{-4} M de FE se pone de manifiesto su actividad contractora, efecto que no aparece cuando se utiliza como agente relajante la NAF. Esta variación en el comportamiento de FE y NAF en músculo liso traqueal podría ser interpretada como una modificación en cuanto a la afinidad por distintos tipos de receptores; no obstante, a las concentraciones tan elevadas a las que aparecen estos efectos no puede descartarse un actuación directa sobre otras estructuras celulares.

III.3. SOBRE CONDUCTO DEFERENTE

La NAF produce una contracción concentración-dependiente del conducto deferente de rata. Relacionando este comportamiento con el presentado por la FE, se observa que existe una disminución en la potencia del derivado acetilado de 251 veces, al tiempo que la FE es 1.5 veces más activa que este derivado. Estos resultados son similares a los obtenidos en aorta aislada de rata, lo que nos ratifica la menor afinidad por los receptores α_1 . Es interesante resaltar también que entre la técnica de conducto deferente y de aorta aislada de rata existe una diferencia de aproximadamente 2 puntos en el valor de pD_2 , que se mantiene para ambos fármacos, tal como ocurre con otros agonistas α .

Como resumen de todo lo indicado anteriormente podemos deducir que la acetilación de la FE produce una disminución en la afinidad por receptores α , tal como indica la menor potencia en vaso y conducto deferente, que se refleja en sus comportamientos hipertensor y depresor del SNC. Los resultados obtenidos nos llevan a pensar que esta modificación estructural podría originar una mayor selectividad por el subtipo de receptor α_{1b} .

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que el derivado acetilado de la FE

1. Tiene una DL_{50} superior a 1000 mg/kg
2. Cuando se administra por vía intravenosa produce una elevación de la presión arterial dosis-dependiente a animales normotensos, significativa a partir de 100 μ g/kg. Este efecto hipertensor es menos potente y menos activo que el manifestado por la FE.
3. Origina una vasoconstricción en aorta aislada de rata, por estimulación de receptores α_1 , mostrándose también menos potente y menos activo que la FE.
4. Presenta una mayor selectividad por el subtipo de receptor α_{1b} que la FE.
5. Consigue un leve efecto inotrópico negativo a partir de concentraciones de 10^{-7} M, sin modificar la frecuencia auricular. En este aspecto su comportamiento difiere del presentado por la FE, que aumentaba la frecuencia y fuerza de contracción.
6. El efecto hipertensor de la NAF depende, por tanto, únicamente de su efecto contractor del músculo liso vascular.
7. La NAF produce una ligera depresión del SNC a dosis 12.5 veces superiores a las activas a nivel de presión arterial.

Conclusiones

8. Este fármaco inhibe totalmente las contracciones inducidas por ACh en tráquea aislada de cobaya, a concentraciones comprendidas entre 5×10^{-4} y 10^{-1} M (10000 veces superiores a las activas como vasoconstrictor).

9. Provoca una contracción del conducto deferente de rata, manteniendo similares diferencias de potencia y actividad en relación a la FE que las existentes a nivel vascular.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMSON, P.; MCWILLIAM, J.R.; BRAMMER, M.J. Y CAMPBELL, I.C. (1987) Synaptosomal free $[Ca^{2+}]$ is reduced by clonidine and dynorphin A-(1-13) and increased by idazoxan. *Eur. J. Pharmacol.* **142**, 261-266.
- ADVENIER, C. Y FLOCH-SAINT-AUBIN, A. (1984) Bronchopulmonary effects of phenylephrine and methoxamine in the guinea-pig. Interaction with bronchoconstrictor drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **100**, 59-69.
- AGRAWAL, D.K.; TRIGGLE, G.R. Y DANIEL, E.E. (1984) Pharmacological characterization of the postsynaptic α -adrenoceptors in vascular smooth muscle from canine and rat mesenteric arterial beds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 364-371.
- AHLQUIST, R.P. (1948) A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* **153**, 586-600.
- AKERS, I.; COATES, J.; DREW, G.M. Y SULLIVAN, A.T. (1989) Antagonist profile of SK&F 104078 at pre- and postjunctional α_2 -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **98**, 655P.
- ALLGAIER, C.; FEUERSTEIN, T.J.; JACKISCH, R. Y HERRTING, G. (1985) Islet activating protein (pertussis toxin) diminishes α_2 -adrenoceptor mediated effects on noradrenaline release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **331**, 235-239.
- ASK, J.A.; STENE-LARSEN, G.; HELLE, K.B. Y RESCH, F. (1987) Functional α -adrenoceptors in human atrial preparations in the presence of β -receptor blockade. *Acta Physiol. Scand.* **131**, 439-445.
- AUGUET, M.; TRICOCHÉ, R. Y BRAQUET, P. (1992) Contractions induced by phenylephrine and noradrenaline are differently affected by endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 129-132.
- AWAD, R.; PAYNE, R. Y DETH, R.C. (1983) α -Adrenergic receptor subtype associated with receptor binding, Ca^{++} influx, Ca^{++} release and contractile events in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**, 60-67.
- BARRIGÓN, S.; DE MIGUEL, B.; TAMARGO, J. Y TEJERINA, T. (1982) The mechanism of the positive inotropic action of ketamine on isolated atria of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **76**, 85-93.
- BAUER, V. (1981) Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum: the action of alpha- and beta-adrenoceptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **72**, 201-210.
- BAUER, V. (1982) Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum: the action of alpha- and beta-adrenoceptor blocking agents. *Br. J. Pharmacol.* **76**, 569-578.
- BECKERINGH, J.J.; THOOLEN, M.J.M.C.; DE JONGE, A.; WILFFERT, B.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Y VAN ZWIETEN, P.A. (1984) The contractions induced in rat and guinea pig aortic strips by the alpha 2-adrenoceptor selective agonists BHT 920 and UK 14.304 are mediated by alpha 1-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **104**, 197-203.
- BENTLEY, S.M.; DREW, G.N. Y WHITING, S.B. (1977) Evidence for two distinct types of

- postsynaptic α -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* **61**, 116P-117P.
- BERTHELSEN, S. Y PETTINGER, W.A. (1977) A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci.* **21**, 595-606.
- BOISSIER, J.R. Y SIMON, P. (1967) Le test de la curiosité pour l'étude du psycholéptiques. *Therapie* **22**, 467.
- BOWMAN, W.C. Y RAND, M.J. (1984) *Farmacología: bases bioquímicas y patológicas*. 2ª ed. Interamericana, Mejiro, pág. 14-17.
- BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. Y WEST, G.B. (1970) *Farmacología*. Jims, Barcelona, pág. 116-117.
- BOYER, J.L.; CÁRDENAS, C.; POSADAS, C. Y GARCÍA-SAINZ, J.A. (1983) Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure produced by α_2 -adrenergic agonists. *Life Sci.* **33**, 2627-2633.
- BRITO, A.R.M.S.; MEDEIROS, I.A. Y MARKUS, R.P. (1989) Do differences in innervation result in different postsynaptic responses to exogenous agonists? *Gen. Pharmacol.* **20**, 65-69.
- BROWN, C.M.; FEDAK, S.A.; WOODARD, C.J.; AURBACH, G.D. Y RODBARD, D. (1976) β -adrenergic receptor interactions. Direct comparison of receptor interaction and biological activity. *J. Biol. Chem.* **251**, 1239-1246.
- BROWN, G.L. Y GILLESPIE, J.S. (1957) The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J. Physiol.* **138**, 81-102.
- BROWN, C.M.; MACKINNON, A.C.; MCGRATH, J.C.; SPEDDING, M. Y KILPATRICK, A.T. (1990) α_2 -Adrenoceptor subtypes and imidazoline-like binding sites in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 803-809.
- BROWN, M.J.; STRUTHER, A.D.; DI SILVIO, L.; YEO, T.; GHATEL, M. Y BURRIN, J.M. (1985) Metabolic and haemodynamic effects of α_2 -adrenoceptor stimulation and antagonism in man. *Clin. Scien.* **68**, 137s-139s.
- BUDAVARI, S. (Ed.) (1989) *The Merck Index*. 11ª ed. Merck and Co. Inc., Rahway, pág. 7257.
- BYLUND, D.B. (1985) Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **22**, 835-843.
- BYLUND, D.B. (1988) Subtypes of α_2 -adrenoceptor: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 356-361.
- BYLUND, D.B. E IVERSEN, L. (1990) Low affinity of SK&F 104078 for bovine pineal gland rat sublingual alpha-2D adrenergic receptors (A2AR): a putative presynaptic alpha-2 subtype. *Pharmacologist* **32**, 144.
- BYLUND, D.B. Y SNYDER, S.H. (1976) Beta adrenergic receptor binding in preparations from mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* **12**, 568-580.

- CABO, J. Y PARDO, P.(1974) *Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia*. 4ª ed. Granada, pág. 291-292.
- CARPENE, C.; LAFONTAN, M. Y BERLAN, M. (1983) Mise en évidence d'une potentialité α_2 -bloquante de la nicergoline par utilisation du récepteur α -adrénergique du tissu adipeux. *J. Pharmacol.* 14, 57-66.
- CASTEELS, R. (1978) Electro- and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Chest* 78, 150-156.
- CAUVIN, C.; LOUTZENHIESER, R.; HWANG, O. Y VAN BREEMEN, C. (1982) α_1 -Adrenoceptors induce Ca influx and intracellular Ca release in isolated rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 84, 233-235.
- CAUVIN, C.; SAIDA, K. Y VAN BREEMEN, C. (1984) Extracellular Ca^{2+} dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels. *Blood Vessels* 21, 23-31.
- CAVERO, I.; SHEPPERSON, N.; LEFEVRE-BORG, F. Y LANGER, S.Z. (1983) Differential inhibition of vascular smooth muscle response for α_1 - and α_2 -adrenoceptor agonists by diltiazem and verapamil. *Circ. Res.* 52, 69-87.
- CHEUNG, D.W. (1985a) An electrophysiological study of α -adrenoceptor mediated excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rat saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* 84, 265-271.
- CHEUNG, D.W. (1985b) The effect of Bay K 8644 on contraction mediated by α -adrenoceptors in the rat saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* 85, 317-319.
- CHEUNG, Y.D.; BARNETT, D.B. Y NAHORSKI, S.R. (1982) [3H]Rauwolscine and [3H]yohimbine binding to rat cerebral and human platelet membranes, possible heterogeneity of α -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 84, 79-85.
- CHIU, A.T.; MCCALL, D.E.; THOOLEN, M.J.M.C. Y TIMMERMANS, P.B.M.W.M. (1986) Ca^{++} utilization in the contraction of rat aorta to full and partial α_2 -adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 224-231.
- CLARE, K.A.; SCRUTTON, M.C. Y THOMPSON, N.T. (1984) Effects of α_2 -adrenoceptor agonists and of related compounds on aggregation of, and on adenylate cyclase activity in, human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 82, 467-476.
- CLOUGH, D.P. Y HATTON, R. (1981) Hypotensive and sedative effects of alpha-adrenoceptor agonists: relationship to alpha 1 and alpha 2-adrenoceptor potency. *Br. J. Pharmacol.* 73, 595-604.
- COLPAERT, F.C. (1986) Maximal magnitude of effect and potency of putative α -adrenoceptor agonists in causing CNS depression, in relaxing muscle, and in lowering body temperature in rat. *Drug Dev. Res.* 7, 209-220.
- CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS (1986) *Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales*. Edica, Barcelona, pág. 10-15.

- COOKE, J.P.; RIMELE, T.J.; FLAVAHAN, N.A. Y VANHOUTTE, P.M. (1985) Nimodipine and inhibition of α -adrenergic activation of the isolated canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 598-602.
- COTECCHIA, S.; SCHWINN, D.A.; RANDALL, R.R.; LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G. Y KOBILKA, B.K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7159-7163.
- CREESE, I.; BURT, D.R. Y SNYDER, S.H. (1975) Dopamine receptor binding. Differentiation of agonist and antagonist states with tritium-labeled dopamine and tritium-labeled haloperidol. *Life Sci.* 17, 993-1001.
- CREWS, F.T. Y SMITH, C.B. (1978) Presynaptic alpha-receptor subsensitivity after long-term antidepressant treatment. *Science* 202, 322-324.
- DE JONGE, A.; SANTING, P.N.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Y VAN ZWIETEN, P.A. (1981) A comparison of peripheral pre- and postsynaptic α_2 -adrenoceptors using meta-substituted imidazolines. *J. Auton. Pharmacol.* 1, 337-383.
- DETH, R.C. Y LYNCH, C. (1981) Inhibition of α -receptor induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx by Mn^{2+} and La^{3+} . *Eur. J. Pharmacol.* 71, 1-11.
- DÍEZ, J.; TAMARGO, J. Y VALENZUELA, C. (1985) Negative inotropic effect of somatostatin in guinea-pig atrial fibres. *Br. J. Pharmacol.* 86, 547-555.
- DI TULLIO, N.W.; CIESLINSKI, L.; MATTHEWS, W.D. Y STORER, B. (1984) Mechanisms involved in the hyperglycaemic response induced by clonidine and other alpha-2 adrenoceptors agonists. *J. Pharm. Exp. Ther.* 228, 168-173.
- DOCHERTY, J.R. Y Mc GRATH, J.C. (1984) The actions of cirazoline on the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 82, 009-014.
- DOHERTY, N.S. Y HANCOCK, A.A. (1983) Role of alpha-2 adrenergic receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 269-274.
- DOHLMAN, H.G.; CARON, M.G. Y LEFKOWITZ, R.J. (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26, 2657-2664.
- DREW, G.M. (1985) What do antagonists tell us about α -adrenoceptors. *Clin. Sci.* 68, 15s-19s.
- DREW, G.M. Y WHITING, S.B. (1979) Alpha 2-adrenoceptors mediate clonidine-induced sedation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 67, 133-141.
- DUARTE, J.; JIMÉNEZ, J.; CABO, J. Y PÉREZ-RAYA, M.D. (1990) Efectos cardiovasculares de algunos compuestos alfa-adrenérgicos. *Ars Pharmaceutica* XXXI, 19-26.
- DUBOCOVICH, M.L. Y LANGER, S.Z. (1974) Negative feed-back regulation of noradrenalina release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency

- of phenoxybenzamine in blocking the pre and post-synaptic adrenergic receptors. *J. Physiol.* 237, 505-519.
- EMMERSON, J. Y MACKEY, D. (1979) The zig-zag tracheal strips. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 798.
- EMORINE, L.J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M.M.; PATEY, G.; TAKE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, G. Y STROBERG, A.D. (1989) Molecular characterization of the human β_2 -adrenergic receptor. *Science (Wash. DC)* 245, 1118-1121.
- FAGBEMI, S.O. Y SALAKO, L.A. (1982) The effects of prazosin, phentolamine and phenoxybenzamine on inhibitory alpha-adrenoceptors in the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* 76, 236-243.
- FAIN, J.N. Y GARCÍA-SAINZ, J.A. (1980) Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 - and of adenylate cyclase inhibition in α_2 -effects of catecholamines. *Life Sci.* 26, 1183-1194.
- FLAVAHAN, N.A. Y VANHOUTTE, P.M. (1986) α_1 -Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 347-349.
- FLÓREZ, J.; ARMIJO, J.A. Y MEDIAVILLA, A. (1987a) *Farmacología humana*. Eunsa, Pamplona, pág. 21.
- FLÓREZ, J.; ARMIJO, J.A. Y MEDIAVILLA, A. (1987b) *Farmacología humana*. Eunsa, Pamplona, pág. 531-535.
- FLÓREZ, J.; ARMIJO, J.A. Y MEDIAVILLA, A. (1987c) *Farmacología humana*. Eunsa, Pamplona, pág. 437-439.
- FURCHGOTT, R.F. (1960) Spiral-cut strips of rabbit aorta for in vitro studies of responses of arterial smooth muscle. *Methods Med. Res.* 8, 117-186.
- FURCHGOTT, R.F. Y ZAWADZKI, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)* 288, 373-376.
- GARCÍA SEVILLA, J.A. (1987) Participación de adrenoceptores alfa-2 en la depresión endógena y en la adicción a opiáceos. *Rev. Farmacol. Clín. Exp.* 4, 181-182.
- GARCÍA SEVILLA, J.A.; GARCÍA VALLEJO, P. Y GUIMÓN, P. (1983) Enhanced α_2 -adrenoceptor mediated platelet aggregation in patients with major depressive disorder. *Eur. J. Pharmacol.* 94, 359-360.
- GARCÍA SEVILLA, J.A.; GUIMÓN, J.; GARCÍA VALLEJO, P. Y FUSTER, M.J. (1986a) Biochemical and functional evidence of supersensitive platelet α_2 -adrenoceptors in major affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 51-57.
- GARCÍA SEVILLA, J.A.; UGEDO, J.; ULIBARRI, I.; ELIZAGÁRATE, E. Y GUTIÉRREZ, M. (1984) Heroin addicts have increased platelet α_2 -adrenoceptor densities which correlate with the severity of the abstinence syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 131-132.
- GARCÍA SEVILLA, J.A.; UGEDO, J.;

- ULIBARRI, I. Y GUTIÉRREZ, J. (1986b) Heroin increases the density and sensitivity of platelet α_2 -adrenoceptors in human addicts. *Psychopharmacology* **88**, 489-492.
- GENGO, P.J.; BOWLING, N.; WYSS, V.L. Y HAYES, J.S. (1988) Effects of prolonged phenylephrine infusion on cardiac adrenoceptors and calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 100-105.
- GILMAN, A.G. (1987) G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-650.
- GODFRAIND, T.; MILLER, R. Y WIBO, M. (1986) Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* **38**, 321-416.
- GOODMAN, L.S. Y GILMAN, A. (1991) *Bases farmacológicas de la Terapéutica*. 8ª ed. Interamericana, Mexico, pág. 104-105.
- GREENBERG, D.A.; U'PRICHARD, D.C. Y SNYDER, S.H. (1976) Alpha-noradrenergic receptor binding in mammalian brain, differential labeling of agonist and antagonist states. *Life Sci.* **19**, 69-76.
- GROSS, G.; HANFT, G. Y RUGEVIC, S. (1988) 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the α_1 -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* **151**, 333-335.
- HALMEKOSKI, J. (1967) A selective N-acetylation of oxedrine. *Farm. Aikak.* **76**, 179-184.
- HAN, C.; ABEL, P.W. Y MINNEMAN, K.P. (1987a) Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* **32**, 505-510.
- HAN, C.; ABEL, P.W. Y MINNEMAN, K.P. (1987b) α_1 -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature (Lond.)* **329**, 333-335.
- HIEBLE, J.P.; SARAU, H.M.; FOLEY, J.J.; DEMARINIS, R.M. Y PENDELTON, R.G. (1982) Comparison of central and peripheral α_1 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **318**, 267-273.
- HIEBLE, J.P.; SULPIZIO, A.C.; EDWARDS, R.; CHAPMAN, H.; YOUNG, P.; ROBERTS, S.P.; BLACKBURN, T.P.; WOOD, M.D.; SHAH, D.H.; DE MARINIS, R.M. Y RUFFOLO, R.R. (1991) Additional evidence for functional subclassification of α_2 -adrenoceptors based on a new selective antagonist, SK&F 104856. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 643-652.
- HIEBLE, J.P.; SULPIZIO, A.C.; NICHOLS, A.J.; DEMARINIS, R.M.; PFEIFFER, F.R.; LAVANCHY, P.G. Y RUFFOLO, R.R. (1986) Pharmacological differentiation of pre- and post-junctional alpha-2 adrenoceptors. *J. Hypertens.* **4**, S189-S192.
- HIEBLE, J.P.; SULPIZIO, A.C.; NICHOLS, A.J.; WILLETTE, R.N. Y RUFFOLO, R.R. (1988) Pharmacologic characterization of SK&F 104078, a novel alpha-2 adrenoceptor antagonist which discriminates between pre- and postjunctional alpha-2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**, 645-652.

- HIEBLE, J.P. Y WOODWARD, D.F. (1984) Different characterization of postjunctional α -adrenoceptors on arterial and venous smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 328, 44-50.
- HIRAMOTO, T.; KUSHIDA, H. Y ENDOH, M. (1988) Further characterization of the myocardial α -adrenoceptors mediating positive inotropic effect in the rabbit myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 152, 301-310.
- HU, J.; CHENG, S. Y QIAN, J. (1986) Effects of α_1 - and α_2 -adrenoceptor agonists on the physiological properties of rat left atria. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi.* 1, 11-15.
- HUCHET, A.M.; CHELLY, J. Y SCHMITT, H. (1981) Role of α_1 - and α_2 -adrenoceptors in the modulation of baroreflex vagal bradycardia. *Eur. J. Pharmacol.* 71, 455-461.
- JAHNEL, U.; NAWRATH, H.; CARMELIET, E. Y VEREECKE, J. (1991) Depolarization-induced influx of sodium in response to phenylephrine in rat atrial heart muscle. *J. Physiol.* 432, 621-637.
- JAKOBS, H.K.; SAUR, W. Y SCHULTZ, G. (1976) Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the α -adrenergic component of epinephrine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 2, 381-392.
- JARD, S.; CANTAN, B. Y JAKOBS, K. H. (1981) L'angiotensin II and α -adrenergic agonist inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256, 2603-2606.
- JENKINSON, D.H. Y MORTON, I.K.M. (1967) The role of α and β -adrenergic receptors in some actions of catecholamines on intestinal smooth muscle. *J. Physiol.* 188, 387-402.
- JOHNSON, R.D. Y MINNEMAN, K.P. (1987) Differentiation of α_1 -adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 31, 239-246.
- JOSEPH, S.; THOMAS, A.; WILLIAMS, R.; IRVINE, R. Y WILLIAMSON, J. (1984) Myo-inositol 1,4,5-trisphosphate: a second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver. *J. Biol. Chem.* 259, 3077-3081.
- KAMIKAWA, Y. Y SHIMO, Y. (1986) Inhibitory effects of sympathomimetic drugs on cholinergically mediated contractions of guinea-pig isolated tracheal muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 742-747.
- KARAKI, H., KUBOTA, H. Y URAKAWA, N. (1979) Mobilization of stores calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 56, 237-245.
- KISHIMOTO, A.; TAKAI, A.; MORI, T.; KIKKAWA, U. Y NISHIZUKA, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255, 2273-2276.
- KNUDTZON, J. (1984) Adrenergic effects on plasma levels of glucagon, insulin, glucose and free fatty acids in rabbits influences of selective blocking drugs. *Acta Physiol. Scand.* 120, 353-

361.

KOBINGER, W. (1978) Central α -adrenergic systems as targets for hypotensive drugs. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **81**, 39-100.

KOBINGER, W. (1975) Medical chemistry related to the central regulation of blood pressure. II pharmacological part. En: Maas, J. (ed.) *Proceedings of the 4th Internat. Sympos. on Medical Chemistry Noordwijkerhout*. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdams, pág. 107-120.

KOBINGER, W. Y KLUPP, H. (1975) Pharmacological evidence for the activation of central α -adrenoceptors by clonidine and related compounds. *Actas Symposium Internacional Hipertensión*. Mónaco, pág. 53-56.

KUHAR, M.J.; DE SOUZA, E.B. Y UNNINNERSTALL, J. (1986) Neurotransmitter receptor mapping by autoradiography and other methods. *Ann. Rev. Neurosci.* **9**, 27-59.

KUSHIDA, H.; HIRAMOTO, T.; SATOH, H. Y ENDOH, M. (1988) Phorbol ester does not mimic, but antagonizes the alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect in the rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **337**, 169-176.

LAFONTAN, M. Y BERLAN, M. (1980) Evidence for the alpha 2 nature of the alpha-adrenergic receptor inhibiting lipolysis in human fat cells. *Eur. J. Pharmacol.* **66**, 87-93.

LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J.P.; LUDUENA, T.P. Y BRAUN, T.G. (1967) Differentiation of receptor systems activated by

sympathomimetic amines. *Nature (Lond.)* **214**, 597-598.

LANGER, S.Z. (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1793-1800.

LANGER, S.Z.; ADLER, E.; ENERO, M.A. Y STEFANO, F.J.E. (1971) The role of the α -receptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation. *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.* **9**, 335.

LATIFPOUR, J.; JONES, S.B. Y BYLUND, D.B. (1982) Characterization of [³H]yohimbine binding to putative alpha-2 adrenergic receptors in neonatal rat lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **223**, 606-611.

LAUBIE, M.; SCHMITT, H. Y DROUILLAT, M. (1976) Action of clonidine on the baroreceptor pathway and medullary sites mediating vagal bradycardia. *Eur. J. Pharmacol.* **38**, 293-303.

LEACH, G.D.H. (1956) Estimation of drug antagonisms on the isolated guinea-pig deferens. *J. Pharm. Pharmacol.* **8**, 501-503.

LEFKOWITZ, R.J. Y CARON, M.G. (1988) Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **263**, 4993-4996.

LEFKOWITZ, R.J.; STADEL, J.M. Y CARON, M. G. (1983) Adenylate cyclase coupled β -adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 159-186.

- LEIJTEN, P.; CAUVIN, C.; LODGE, N.; SAIDA, K. Y VAN BREEMEN, C. (1985) Ca^{2+} sources mobilized by α_1 -receptor activation in vascular smooth muscle. *Clin. Sci.* **68**, 47s-50s.
- LIMBIRD, L.E. (1984) GTP and Na^+ modulate receptor-adenyl cyclase coupling and receptor-mediated function. *Am. J. Physiol.* **247**, E59-E68.
- LOMASNEY, J.W.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F.; COTECCHIA, S.; REGAN, J.W.; DEBERNARDIS, J.F.; CARON, M.G. Y LEFKOWITZ, R.J. (1986) Mammalian α_1 -adrenergic receptor: purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J. Biol. Chem.* **261**, 7710-7716.
- MAROTO, R.; SUSO, F.J. Y MORATINOS, J. (1987) Receptores adrenérgicos involucrados en la glucogenolisis en cortes hepáticos de perro. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* **4**, 252.
- MARVOLA, M. (1976) Effect of acetylated derivatives of some sympathomimetic amines on the acute toxicity, locomotor activity and barbiturate anaesthesia time in mice. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* **38**, 474-489.
- MARVOLA, M.; PIIRAINEN, L.; ANTIO, S. Y AIRAKSINEN, M. (1977) Effect of acetylated derivatives of some sympathomimetic amines on the isolated auricles and tracheal chain of the guinea-pig. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* **40**, 33-41.
- MATTHEWS, W.D.; MCCAFFERTY, G.P. Y GROUS, M. (1984) Characterization of α -adrenoceptors on vascular smooth muscle: electrophysiological differentiation in canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**, 355-360.
- MEDGETT, I.C. Y LANGER, S.Z. (1984) Heterogeneity of smooth muscle α -adrenoceptors in rat tail artery in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 823-830.
- MICHEL, A.D.; LOURY, D.N. Y WHITING, R.L. (1990) Assessment of imiloxan as a selective α_{2B} -adrenoceptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 560-564.
- MICHELL, R.H. (1979) Inositolphospholipids in membrane function. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 128-131.
- MILLER, L.C. Y TAINTER, M.L. (1944) Estimation of the DL_{50} and its error by means of logarithmic-probit graphpaper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**, 261-264.
- MINNEMAN, K.P. (1988) α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* **40**, 87-119.
- MINNEMAN, K.P.; HAN, C. Y ABEL, P.W. (1988) Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chlorethylclonidine and WB-4101. *Mol. Pharmacol.* **33**, 509-514.
- MORAN, N.C. Y PERKINS, M.E. (1958) Adrenergic blockade of the mammalian heart by a dichloro analogue of isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **124**, 223-237.
- MORANTINOS, J.; OLMEDILLA, B.; DE PABLOS, I. Y VIGUERAS, M.D. (1986) α -

- adrenoceptors involvement in catecholamine-induced hyperglycaemia in conscious fasted rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **89**, 55-66.
- MORROW, A.L.; BATTAGLIA, G. NORMAN, A.B. Y CREESE, I. (1985) Identification of subtypes of [³H]prazosin labelled α_1 -receptor binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **109**, 285-287.
- MORROW, A.L. Y CREESE, I. (1986) Characterization of α_1 -receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [³H]WB4101 and [³H]prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* **29**, 321-330.
- MOTLEY, E.D.; RUFFOLO, R.; HAY, D. Y NICHOLS, A. (1990) Comparison of phosphatidylinositol turnover induced by full and partial α_1 -adrenoceptor agonists in the rat aorta. *FASEB J.* **4**, A807.
- MUKHERJEE, C.; CARON, M.G.; MULLIKIN, D. Y LEFKOWITZ, R.J. (1976) Structure-activity relationship of adenylate cyclase-coupled beta adrenergic receptors; determination by direct binding studies. *Mol. Pharmacol.* **12**, 16-31.
- MURPHY, T.J. Y BYLUND, D.B. (1988) Characterization of alpha-2 adrenergic receptors in the OK cell, an opossum kidney cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 571-578.
- MYERS, R.D.; BELESLIN, D.B. Y REZVANI, A.H. (1987) Hypothermia: role of α_1 - and α_2 -noradrenergic receptors in the hypothalamus of the cat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **26**, 373-379.
- NAKAKI, T.; NAKADATE, T.; ISHII, K.; MURAKI, T. Y KATO, R. (1981) postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3',5'- adenosine monophosphate accumulation. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **216**, 612-617.
- NICHOLS, A.J.; MOTLEY, E.D. Y RUFFOLO, R.R. (1988) Differential effect of pertussis toxin on pre- and postjunctional alpha-2 adrenoceptors in the cardiovascular system of the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.* **145**, 345-349.
- NICHOLS, A.J.; MOTLEY, E.D. Y RUFFOLO, R.R. (1989) 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.* **249**, 203-209.
- ONESTI, G.; SCHWARTZ, A.B.; KIM, K.E.; PAZ-MARTÍNEZ, V. Y SWARTZ, C. (1971) Antihypertensive effects of clonidine. *Circ. Res.* **28**, 53-69.
- ORIOWO, M.A.; NICHOLS, A.J. Y RUFFOLO, R.R. (1990) A single α_1 -adrenoceptor population coupled to two signal transduction processes may mediate contraction of the rat aorta. *FASEB J.* **4**, A807.
- OTANI, H. (1988) Pharmacological study on the role of phosphoinositide breakdown in inotropic response mediated by phenylephrine-induced stimulation of α_1 -adrenoceptors in the rat left ventricular papillary muscle. *Kansai Ika Daigaku Zasshi* **40**, 44-57.

- OTANI, H., OTANI, H. Y DAS, D.K. (1988) α_1 -Adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscles. *Circ. Res.* **62**, 8-17.
- PÉREZ-VIZCAÍNO, F., DUARTE, J. Y TAMARGO, J. (1991) Effects of flecainide in isolated vascular smooth muscle of rat. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 726-730.
- PETRASH, A.C. Y BYLUND, D.B. (1986) Alpha-2 adrenergic receptor subtypes indicated by [3 H]yohimbine binding in human brain. *Life Sci.* **38**, 2129-2137.
- PETTINGER, W.A. (1977) Unusual α -adrenergic receptor potency of methyl dopa metabolites on melanocyte function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **201**, 622-626.
- POGGIOLI, J. Y PUTNEY, J.W. (1982) Net calcium fluxes in rat parotid acinar cells. Evidence for a hormone-sensitive calcium pool in or near the acinar plasma membrane. *Pflügers Arch.* **392**, 239-243.
- POWELL, C.E. Y SLATER, I.H. (1958) Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **122**, 480-488.
- RANDALL, M.H.; ALTMAN, L.J. Y LEFKOWITZ, R.J. (1977) Structure and biological activity of (-)-(3 H)dihydroalprenolol, a radioligand for studies of β -adrenergic receptors. *J. Med. Chem.* **20**, 1090-1097.
- RASMUSSEN, H., FORDER, J.; KAJIMA, I. Y SRIABINE, A. (1984) TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 776-784.
- REESE, J.B. Y MATTHEWS, W.D. (1986) α -Adrenergic agonists stimulate phosphatidylinositol (PI) hydrolysis in canine saphenous vein. *Pharmacologist* **28**, 161.
- ROBISHAW, J.D. Y FOSTER, K.A. (1989) Role of G proteins in the regulation of the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 229-244.
- ROQUEBERT, J.; DEMICHEL, P.; GOMOND, P. Y MALEK, A. (1983) Activité de la dihydroergocristine sur les alpha-adrénocepteurs pré- et postsynaptiques du canal déferent isolé du rat. *J. Pharmacol.* **14**, 151-159.
- RUFFOLO, R.R.; FOWBLE, J.W.; MILLER, D.D. Y PATIL, P.N. (1976) Binding of (3 H)dihydroazepetine to alpha-adrenoceptors-related proteins from rat vas deferens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2730-2734.
- RUFFOLO, R.R.; MESSICK, K. Y HORNOG, J.S. (1984a) Interactions of three inotropic agents, ASL-7022, dobutamine and dopamine, with α_1 - and α_2 -adrenoceptors in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **326**, 317-326.
- RUFFOLO, R.R.; MORGAN, E.L. Y MESSICK, K. (1984b) Possible relationship between receptor reserve and the differential antagonism of α_1 - and α_2 - adrenoceptor mediated pressor responses by calcium channel antagonists in pithed rat. *J. Pharmacol. Exp.*

Ther. 230, 587-594.

RUFFOLO, R.R.; MOTLEY, E.D. Y NICHOLS, A.J. (1991a) The effect of pertussis toxin treatment on postjunctional α_1 -adrenoceptor mediated vasopressor effects to the full agonist, cirazoline, and the partial agonist, (-)-dobutamine, in pithed rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 5, 11-23.

RUFFOLO, R.R.; NICHOLS, A.J.; STADEL, J.M. E HIEBLE, J.P. (1991b) Structure and function of α -adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 43, 475-505.

RUFFOLO, R.R. Y WADDELL, J.E. (1982) Receptors interactions of imidazolines: α -adrenoceptors of rat and rabbit aorta differentiated by relative potencies, affinities and efficacies of imidazoline agonists. *Br. J. Pharmacol.* 77, 169-176.

RUFFOLO, R.R. Y ZEID, R.L. (1985) Relationship between α -adrenoceptor occupancy and response for the α_1 -adrenoceptor agonist, cirazoline, and the α_2 -adrenoceptor agonist, B-HT 933, in canine saphenous vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235, 636-643.

SALMON, D. Y HONEYMAN, T. (1980) Proposed mechanism of cholinergic action in smooth muscle. *Nature (Lond.)* 284, 344-345.

SATOH, H. Y HASHIMOTO, K. (1988) Effect of α_1 -adrenoceptor stimulation with methoxamine and phenylephrine on spontaneously beating rabbit sino-atrial node cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337, 415-422.

SCHIEMEL, R.J. (1976) Roles of α - and β -adrenoceptors in the control of glucose oxidation in hamster epididymal adipocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 428, 376-387.

SCHOLZ, J.; SCHAEFER, B.; SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; STEINFATH, M.; LOHSE, M.; SCHAWABE, U. Y PUURUNEN, J. (1988) Alpha-1 adrenoceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 327-335.

SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W. Y HESCHELER, J. (1990) Role of G proteins in calcium channel modulation. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 275-292.

SKARBY, T.V.C.; ANDERSON, K.E. Y EDVINSSON, L. (1983) Pharmacological characterization of postjunctional α -adrenoceptors in isolated feline cerebral and peripheral arteries. *Acta Physiol. Scand.* 117, 63-73.

STAHL, S.M.; LEENDERS, K.L. Y BOWERY, N.G. (1986) Imaging neurotransmitter and their receptors in living human brain by positron emission tomography. *Trends Neurosci.* 9, 241-245.

STARKE, K. (1972b) Influence of extracellular noradrenaline on the stimulation-evoked secretion of noradrenaline from sympathetic nerves: evidence for an α -receptor mediated feed-back inhibition of noradrenaline release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275, 11-23.

STARKE, K. (1972a) α -Sympathomimetic

- inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 274, 18-45.
- STARKE, K.; ENDO, T. Y TAUBE, H.D. (1975) Relative pre and postsynaptic potencies of α -adrenoceptor agonist in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 291, 55-78.
- STARKE, K.; MONTEL, H.; GAYK, W. Y MERKER, R. (1974) Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 285, 133-150.
- STARKE, K.; MONTEL, H. Y SCHUMANN, H.J. (1971a) Influence of cocaine and phenoxybenzamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 270, 210-214.
- STARKE, K.; MONTEL, H. Y WAGNER, J. (1971b) Effect of phentolamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 271, 181-192.
- STEWART, G. (1958) The action of digitalis leaf preparations and of cardiac glycosides on the isolated right ventricle of the guinea-pig. *J. Pharm. Pharmacol.* 10, 741-748.
- STRADER, C.D.; SIGAL, I.S. Y DIXON, R.A.F. (1989) Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 3, 1825-1832.
- STUBBS, D.; SMITH, J.W.; WILSON, K.A. Y DOWNING, O.A. (1988) cAMP levels in the femoral vein of the rat following α_1 - and α_2 -adrenoceptor stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 95, 564P.
- SUEMATSU, E.; HIRATA, M.; SASAGURI, T.; HASHIMOTO, T. Y KURIYAMA, H. (1985) Roles of Ca^{2+} on the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced release of Ca^{2+} from saponin-permeabilized single cells of the porcine coronary artery. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 82, 645-649.
- SUGRUE, M.F. (1983) Chronic antidepressant therapy and associated changes in central monoaminergic receptor functioning. *Pharmac. Ther.* 21, 1-33.
- SULPIZIO, A.C. E HIEBLE, J.P. (1991) Lack of a pharmacological distinction between α_1 -adrenoceptors mediating intracellular calcium dependent and independent contractions to sympathetic nerve stimulation in the perfused rat caudal artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 1045-1052.
- TAKAYANAGI, I.; KAWANO, K. Y KOIKE, K. (1990) α_2 -Adrenoceptor mechanisms in guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 182, 577-580.
- THOENEN, H.; HURLIMAN, A. Y LAEFELY, W. (1964) Dual site of action of phenoxybenzamine in the cat's spleen, blockade of α -adrenergic receptors and inhibition of reuptake of neurally released norepinephrine. *Experientia (Basel)* 20, 272-273.
- TIBIRICA, E.; FELDMAN, J.; MERMET, C.; GONON, F. Y BOUSQUET, P. (1991) An imidazoline-specific mechanism for the

- hypotensive effect of clonidine: a study with yohimbine and idazoxan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 606-613.
- TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; SCHOOP, A.M.C.; KWA, H.Y. Y VAN ZWIETEN, P.A. (1981) Characterization of alpha-adrenoceptors participating in the central hypotensive and sedative effects of clonidine using yohimbine, rauwolscine and corynanthine. *Eur. J. Pharmacol.* 70, 7-15.
- TINTORE, I. (1981) Evaluación cuantitativa automática de la actividad espontánea. Validación método I. *Arch. Farmacol. Toxicol.* 7, 79-81.
- TOHSE, N. (1988) Analysis of membrane current system involved in the inotropic effects mediated by α -adrenoceptors in the heart. *Hokkaido Igaku Zasshi* 63, 754-771.
- TSUJIMOTO, G.; TIMMINS, P.V. Y HOFFMAN, B.B. (1986) Alpha adrenergic receptors in the rabbit bladder base smooth muscle: alpha-1 adrenergic receptors mediate contractile responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236, 384-389.
- VAN MEEL, J.C.A.; DE JONGE, A.; KALKMAN, H.O.; WILFFERT, B.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Y VAN ZWIETEN, P.A. (1981) Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic α_2 -adrenoceptors. *Nannyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 316, 288-293.
- VAN ROSSUM, J.M. (1963) Cumulative dose-curves II. Techniques for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Ind. Pharmacodyn. Ther.* 143, 229-230.
- VAN ZWIETEN, P.A. Y TIMMERMANS, P.B.M.W.M. (1983) Pharmacology and characterization of central α -adrenoceptors involved in the effect of centrally acting antihypertensive drugs. *Chest* 83, 340-343.
- WANG, R.Y. Y AGHAJANIAN, G.K. (1980) Enhanced sensitivity of amygdaloid neurons to serotonin and norepinephrine after chronic antidepressant treatment. *Psychopharmac. Commun.* 4, 83-90.
- WATERFALL, J.F.; RHODES, K.F. Y LATTIMER, N. (1985) Studies of α_2 -adrenoceptor antagonist potency in vitro: comparisons in tissues from rats, rabbits, dogs and humans. *Clin. Sci.* 68, 21s-24s.
- WATSON, S. Y ABBOTT, A. (1992) Receptor nomenclature. *Trends Pharmacol. Sci. Supplement*, 1-36.
- WENZEL, D.G. Y SU, J.L. (1966) Interactions between sympathomimetic amines and blocking agent on the rat ventricle strip. *Arch. Internation. Pharmacodyn. Therap.* 160, 379-389.
- ZARZUELO, A.; DUARTE, J., JIMÉNEZ, J., GONZÁLEZ, M. Y UTRILLA, M.P. (1991) Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med.* 57, 417-419.