

T.O. 295

B

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis Doctoral

EFECTOS CEREBROVASCULARES DE LOS FARMACOS BLOQUEADORES
DE LA ENTRADA DE Ca^{2+}

Memoria presentada por
D. Juan B. Salom Sanvalero
para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Burjassot, Enero 1989.

BIBLIOTECA
FACULTAT DE C. BIOLÒGiques
VALÈNCIA

UMI Number: U607661

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607661

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Rc. 18804007

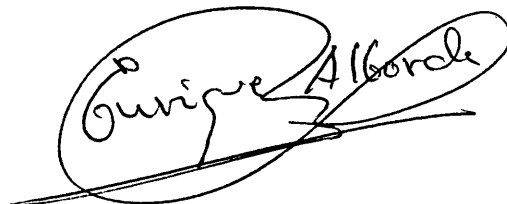
R. 6998

D. Enrique Alborch Domínguez, Director del Centro de Investigación del Hospital "La Fe", y Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICO:

Que D. Juan B. Salom Sanvalero, Licenciado con Grado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección, en el Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia, el trabajo experimental conducente a la elaboración de su Tesis Doctoral titulada "Efectos cerebrovasculares de los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} ".

Y para que así conste, expido el presente en Valencia, a nueve de enero de mil novecientos ochenta y nueve.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, loopy oval shape. The signature reads "Enrique Alborch" in a cursive script. There is a horizontal line drawn across the bottom of the signature.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. D. Enrique Alborch Domínguez, Director del Centro de Investigación del Hospital "La Fe", su labor de dirección en la realización del presente trabajo.

A D. Germán Torregrosa Bernabé, Adjunto de la Unidad de Circulación Cerebral, a D. Francisco Javier Miranda Alonso, becario del F.I.S.S.S., a D. Vicente Campos Alborg, becario de la Generalitat Valenciana, a D. José Antonio Alabadí Ferrer, becario del F.I.S.S.S., y a D. Juan Carlos Terrasa Nicolau, ex-colaborador de nuestro laboratorio, su apoyo y cooperación a lo largo del trabajo.

A las señoritas Auxiliares de Clínica Lucía Martínez López y M. Carmen Tirados García, su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A todos cuantos de algún modo han intervenido en la realización del trabajo, deseo agradecer su colaboración.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- MATERIAL Y METODOS	13
2.1.- Modelo experimental "in vitro": medición de la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales aisladas	13
2.1.1.- Preparación experimental y sistema de registro	13
2.1.2.- Procedimiento experimental	14
2.1.3.- Fármacos y soluciones	15
2.1.4.- Protocolo experimental	16
2.1.5.- Análisis de los resultados	17
2.2.- Modelo experimental "in vivo": medición del flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestésicar	18
2.2.1.- Consideraciones anatómicas y fisiológicas acerca del lecho vascular cerebral de la cabra	18
2.2.2.- Técnica quirúrgica: preparación vascular para la medición del flujo sanguíneo cerebral y de la presión arterial	19
2.2.3.- Procedimiento experimental	22
2.2.4.- Fármacos y soluciones	24

2.2.5.- Protocolo experimental	24
2.2.6.- Análisis de los resultados	25
3.- RESULTADOS	26
3.1.- Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales aisladas	26
3.1.1.- Importancia del Ca^{2+} extracelular en la contracción de las arterias cerebrales	26
3.1.1.1.- Efecto del $CaCl_2$ sobre las arterias cerebrales	26
3.1.1.2.- Contracción de las arterias cerebrales en medio sin Ca^{2+}	26
3.1.1.2.1.- Contracción con KCl	26
3.1.1.2.2.- Contracción con noradrenalina	27
3.1.1.2.3.- Contracción con 5-hidroxitriptamina	27
3.1.1.2.4.- Contracción con prostaglandina $F_{2\alpha}$	27
3.1.1.2.5.- Comparación de los diferentes es- tímulos contráctiles	28
3.1.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales precontraídas	28
3.1.2.1.- Precontracción con KCl	28
3.1.2.2.- Precontracción con prostaglandina $F_{2\alpha}$	29

3.1.3.- Efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de las arterias cerebrales	29
3.1.3.1.- Contracción con CaCl ₂	29
3.1.3.2.- Contracción con KCl	30
3.1.3.3.- Contracción con noradrenalina	31
3.1.3.4.- Contracción con 5-hidroxitriptamina	31
3.1.3.5.- Contracción con prostaglandina F _{2α}	32
3.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral (FSC)	33
3.2.1.- Efecto "per se" de los fármacos BECa sobre el FSC	33
3.2.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del FSC	35
3.2.2.1.- Reducción del FSC con noradrenalina	35
3.2.2.2.- Reducción del FSC con 5-hidroxitripta- mina	36
3.2.2.3.- Reducción del FSC con prostaglandina F _{2α}	37
4.- FIGURAS	39
5.- TABLAS	88
6.- DISCUSION	110
6.1.- Consideraciones metodológicas	110

6.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales aisladas	114
6.2.1.- Reactividad de las arterias cerebrales frente a la despolarización y los agonistas	114
6.2.2.- Importancia del Ca^{2+} extracelular en la contracción de las arterias cerebrales	117
6.2.3.- Efecto relajante de los fármacos BECa en las arterias cerebrales	122
6.2.4.- Efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de las arterias cerebrales	124
6.3.- Efecto de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral (FSC)	127
6.3.1.- Efecto "per se" de los fármacos BECa	127
6.3.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del FSC	130
7.- CONCLUSIONES	132
8.- BIBLIOGRAFIA	134

1.- INTRODUCCION

El tejido cerebral utiliza, para su funcionamiento normal, la degradación oxidativa de la glucosa como única fuente energética. Además, el tejido cerebral no almacena glucógeno ni ninguna otra forma de reserva energética. Por lo tanto, el cerebro requiere un flujo sanguíneo continuo que aporte glucosa y oxígeno. Tanto es así que la isquemia cerebral completa durante tan sólo 5 segundos produce pérdida de conciencia y si se prolonga algunos minutos se produce daño cerebral irreversible (1).

Ante tan estrictos requerimientos, no ha de extrañarnos que el proceso evolutivo de teleencefalización haya incluido el desarrollo de una compleja base anatómica y funcional que asegure un flujo sanguíneo cerebral adecuado en todo momento. Anatómicamente, el polígono de Willis en la base del cerebro constituye un sistema de anastomosis arteriales que evita la isquemia de un territorio cerebral al facilitar vías alternativas ante una eventual oclusión (1). Funcionalmente, la regulación del flujo sanguíneo cerebral, su adecuación a las necesidades metabólicas del cerebro, es debida a la intervención de numerosos factores (metabólicos, neurogénicos, mecánicos y humorales), que actúan conjuntamente sobre la pared de los vasos cerebrales modificando su resistencia, o variando la presión de perfusión (2).

El músculo liso de las arterias cerebrales es el responsable de las modificaciones en la resistencia vascular. Metabolitos, como el H^+ , el CO_2 y la adenosina; neurotransmisores, como la noradrenalina, la acetilcolina y la serotonina; estímulos mecánicos, como cambios de presión; y sustancias circulantes, como la histamina, el ácido γ -aminobutírico, prostaglandinas y neuropéptidos actúan sobre el músculo liso cerebrovascular modificando su tensión (2). Sin embargo, aunque los estímulos capaces de modificar la resistencia cerebrovascular sean diversos (Figura 1), a nivel del

músculo liso todos ellos se traducen en alteraciones de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular. A concentraciones 10^{-7}M de Ca^{2+} el músculo liso se mantiene en reposo, mientras que concentraciones alrededor de 10^{-5}M desencadenan la contracción muscular (3).

El Ca^{2+} posee un papel primordial en la activación de los miofilamentos del músculo liso. Si bien este mecanismo de activación no está totalmente establecido, si se conoce lo suficiente de él como para diferenciarlo claramente del mecanismo de activación en el músculo esquelético (4). Brevemente, con la unión del Ca^{2+} a la calmodulina (CM), una proteína con alta afinidad por este ión, se forma el complejo Ca-CM, el cual a su vez se une a la quinasa (enzima fosforilador) de la cadena ligera de la miosina (QCLM) para formar el complejo CaCM-QCLM. Este complejo cataliza la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM), lo cual estimula el ciclo de interacciones actina-miosina, desencadenando la contracción muscular (Figura 2). La actuación catalítica de una proteína-fosfatasa revierte todo este proceso al desfosforilar la CLM (5). Recientemente, se ha propuesto un modelo de activación por Ca^{2+} que amplía el esquema ya explicado. Según este modelo, la CLM fosforilada interviene en el acortamiento inicial rápido del músculo liso, mientras que el mantenimiento en la contracción tónica se debe a la activación por el Ca^{2+} del complejo actomiosina ya desfosforilado (6).

El Ca^{2+} libre intracelular necesario para la contracción del músculo liso tiene una procedencia doble: (a) las reservas intracelulares, y, (b) el medio extracelular (7) (Figura 3). El contenido total de Ca^{2+} intracelular de las células musculares lisas en reposo es mucho mayor del necesario para alcanzar el umbral de concentración de Ca^{2+} libre intracelular que desencadena la contracción muscular. Por ejemplo, la aorta de conejo contiene $3-5 \times 10^{-4}$ mol Ca/Kg de H_2O celular, mientras que 10^{-7}M es el umbral de activa-

ción. Por lo tanto, la mayor parte de esta gran reserva de Ca^{2+} debe encontrarse ligada a algún componente celular, constituyendo una fuente potencial de Ca^{2+} activador (3). Mediante técnicas de microanálisis en microscopía electrónica se han podido localizar estructuras celulares capaces de almacenar Ca^{2+} . Principalmente, estas estructuras son el retículo sarcoplásmico, la cara interna del plasmalema, y las mitocondrias. Sin embargo, no está completamente aclarado si todos estos depósitos intracelulares actúan realmente en el proceso de contracción. Además, no se descarta la existencia de otros depósitos inaccesibles mediante las técnicas utilizadas (8).

La liberación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} se produce tras la activación del músculo liso con agonistas como la noradrenalina, angiotensina II, histamina, serotonina, vasopresina y prostaglandinas. Además, se ha descrito un proceso mediante el cual el propio Ca^{2+} libre induce la liberación de más Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (7). La liberación de Ca^{2+} intracelular se ha asociado con el incremento de la concentración de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Se ha propuesto un modelo en el que la unión de un agonista a su receptor en la membrana celular activa el enzima fosfolipasa C, encargado de catalizar la reacción que transforma el fosfatidil inositol en IP3, actuando éste último como el mensajero intracelular que activa la liberación de Ca^{2+} (4). Si bien la localización del Ca^{2+} intracelular y el mecanismo de liberación no están totalmente aclarados, si se ha establecido que la contribución del Ca^{2+} intracelular al proceso de contracción no es cuantitativamente igual en los diferentes músculos lisos y, además, también depende del agonista que provoca la contracción (7). En cualquier caso, la proximidad de las reservas intracelulares con los filamentos contráctiles las hacen apropiadas para desencadenar respuestas rápidas tras la estimulación del músculo.

La segunda fuente de Ca^{2+} que interviene en la contracción del músculo liso es el medio extracelular. Mientras que la concentración de Ca^{2+} libre intracelular en el músculo liso en reposo es menor de 10^{-7}M , el medio extracelular posee concentraciones de Ca^{2+} alrededor de 10^{-3}M (3), existiendo, además del Ca^{2+} libre, otra fuente de Ca^{2+} extracelular ligado a la cara externa del plasmalema. Los sitios de unión potenciales incluyen las proteínas y fosfolípidos cargados negativamente, el ácido siálico del glicocálix, así como la elastina y el colágeno de la matriz extracelular (7). En experimentos con Ca^{2+} radiactivo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) se puede demostrar y cuantificar el intercambio del Ca^{2+} libre con el Ca^{2+} ligado extracelulares. Además, la entrada de Ca^{2+} al músculo liso está relacionada con las reservas intracelulares de Ca^{2+} a través de los procesos de liberación de Ca^{2+} inducidos por el propio Ca^{2+} y de almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico. El primero de estos procesos supone un mecanismo de amplificación de la señal cálcica, mientras que el segundo supone una capacidad de tamponamiento del Ca^{2+} activador (4).

La entrada de Ca^{2+} a las células del músculo liso se produce por simple difusión pasiva o "goteo" en estado de reposo, cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular es alrededor de 10^{-3}M y la intracelular de 10^{-7}M . Sin embargo, esta vía de entrada para el Ca^{2+} no parece tener un papel, al menos primordial, en la activación del músculo liso. La principal vía de entrada de Ca^{2+} al músculo liso para su activación la constituyen los canales de Ca^{2+} del plasmalema (4). Un canal de Ca^{2+} es una estructura macromolecular formada esencialmente por una o más glicoproteínas, con una configuración aproximadamente cilíndrica y un poro acuoso en el centro (9).

A pesar de que el fenómeno de permeabilidad al Ca^{2+} en células excitables se apreció hace ya 30 años, casi tanto como la permeabilidad al Na^+ y K^+ , el conocimiento del

primero ha sido hasta recientemente muy escaso en comparación con los segundos. Esto se debía a la carencia de preparaciones experimentales y fármacos apropiados (10). Actualmente esta dificultad se ha salvado, conociéndose ya la existencia de varios tipos de canales de Ca^{2+} . Por una parte, existen canales dependientes de voltaje (CDV), cuya activación se produce mediante la despolarización de la membrana celular, y, por otro lado, existen canales dependientes de receptor (CDR), cuya activación se produce con la unión de un agonista a su receptor específico (11) (Figura 3).

Mediante técnicas electrofisiológicas y farmacológicas se han definido tres tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje: canales T (transitorios), L (persistentes, la sigla corresponde al término inglés "long lasting") y N (neuronales). Los canales L y T se han identificado en células neuronales, cardíacas, musculares lisas, musculares esqueléticas y secretoras. Los canales N se han descrito sólo en neuronas, siendo éste el hecho diferencial que les confiere su sigla, si bien otras propiedades electrofisiológicas, como la conductancia, y su perfil farmacológico, los diferencian de los T y L (12, 13). En el músculo liso vascular se han descrito dos tipos de corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje que, si bien muestran conductancias que se ajustan a la clasificación T y L, presentan alguna discrepancia farmacológica (11).

Los canales de Ca^{2+} dependientes de receptor se han estudiado menos y, por lo tanto, se conoce poco acerca del mecanismo de activación de estos canales (11). Existen varias propuestas: (a) el propio receptor contiene el canal o está íntimamente ligado a él, (b) una proteína con afinidad por el GTP media la activación, (c) la activación se produce por cambios en la composición fosfolipídica de la membrana debidos a la activación de la fosfolipasa C, y, (d) el inositol 1,4,5-trifosfato, producto de la acción de la fos-

folipasa C, actúa como segundo mensajero en la activación de los canales (14). Las contracciones inducidas por la noradrenalina, algunas prostaglandinas y la histamina en el músculo liso arterial se han asociado a incrementos en la entrada de Ca^{2+} . No obstante, un agonista puede estimular la entrada de Ca^{2+} directamente (acoplamiento farmaco-mecánico) o indirectamente, mediante la despolarización de la membrana. Al menos para la noradrenalina y la histamina, se ha demostrado que incrementan la entrada de Ca^{2+} sin que se produzca despolarización. Además, incluso en el caso de producirse despolarización, la relación causal entre el flujo de Ca^{2+} y la despolarización resulta difícil de establecer. Por último, hasta la fecha no está claro si los diferentes agonistas activan una sola población de canales de Ca^{2+} o varias (7).

Tanto la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares como la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular contribuyen al incremento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular, activador de la contracción muscular. Para mantener la homeostasia del Ca^{2+} y devolver al músculo a su estado de reposo existen varios mecanismos celulares capaces de reducir la concentración de Ca^{2+} activador (15). Por un lado están los mecanismos de extracción de Ca^{2+} a través del plasmalema y, por otro lado, la recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias. Los mecanismos de extracción son dos: (a) el transporte activo de Ca^{2+} a cargo de una ATPasa de membrana y (b) el intercambio de Ca^{2+} por Na^+ , cuantitativamente menos importante (5). La recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico está a cargo de una ATPasa diferente de la aislada en el plasmalema (16).

Los fármacos calcioantagonistas (Ca^{2+} -antagonistas) son sustancias que interfieren la función celular del Ca^{2+} . Los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} (BECa) son un grupo particular de Ca^{2+} -antagonistas que inhiben la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de la membrana celular (17,

18). En el caso del tejido muscular liso, esta acción se traduce en la inhibición de la contractilidad en la medida en que el Ca^{2+} extracelular se requiera para dicho proceso, mientras que, la contractilidad muscular dependiente de la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares no es afectada por los fármacos BECa (19). Aunque la distinción hecha entre Ca^{2+} -antagonista y BECa es sencilla y clara, no existe unanimidad en la denominación de los fármacos BECa, lo cual puede crear cierta confusión. Algunos autores utilizan términos como "bloqueadores de los canales de Ca^{2+} " (20, 21), "bloqueadores de los canales lentos" e "inhibidores de la sobrecarga de Ca^{2+} " para referirse a los BECa (18). Incluso se emplea a menudo el término más general " Ca^{2+} -antagonistas" para aludir a los BECa (5, 17, 19), lo cual supone cierta imprecisión pero ha sido defendido alegando que " Ca^{2+} -antagonista" es un término más acorde con la utilidad terapéutica de estos fármacos (22).

Desde que a principios de los años 60 se descubrieron los primeros fármacos BECa (22), la lista de estos compuestos ha crecido y sigue creciendo en la actualidad, constituyendo un grupo químicamente heterogeneo (23) en el que podemos establecer la siguiente clasificación (24, 25):

(a) dihidropiridinas: constituyen el apartado más numeroso, con la nifedipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, niludipina, felodipina, ryosidina, PN-200-110 y otras.

(b) derivados de la papaverina, como el verapamil, gallopamil (D-600) y tiapamil.

(c) difenilalquilaminas, como la cinarizina, la flunarizina y la lidoflacina.

(d) benzotiazepinas, cuyo único representante es el diltiazem.

La lista de fármacos BECa no está cerrada, sintetizándose continuamente nuevos compuestos de los grupos descritos, con ligeras modificaciones a fin de mejorar su actividad (26). Además, recientemente se han descrito fármacos BECa químicamente muy diferentes a los existentes, como la ω -conotoxina (27), las 2-etinilbenzenoalcanaminas (28) y las benzolactamas (29).

Las primeras evidencias de que los fármacos BECa ejercían su acción interfiriendo la entrada de Ca^{2+} extracelular fueron indirectas. Por ejemplo, dichos fármacos imitaban el efecto de la eliminación del Ca^{2+} extracelular, su acción era mucho menor en medio sin Ca^{2+} y se antagonizaba incrementando la concentración de Ca^{2+} extracelular. Estas evidencias indirectas llevaron a la descripción de una acción farmacológica " Ca^{2+} -antagonista" (22). La utilización del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ como marcador para estudiar los flujos celulares de Ca^{2+} ha permitido obtener evidencias más directas sobre el mecanismo de acción de los BECa, los cuales inhiben la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ al músculo liso paralelamente a la inhibición de la contracción muscular (30, 31). De ahí su denominación más precisa, reservando el término Ca^{2+} antagonista para describir una acción farmacológica más amplia, que implique a cualquiera de las funciones celulares del Ca^{2+} .

El mecanismo de acción de los fármacos BECa no es inespecífico, como pudiera ser un efecto estabilizador de membrana o un taponamiento físico de los canales de Ca^{2+} , sino que responde a una interacción específica entre los BECa y receptores de la membrana celular. En primer lugar, los fármacos BECa presentan una serie de requerimientos estructurales para la expresión de su actividad farmacológica, como ha sido especialmente puesto de manifiesto para las dihidropiridinas. Esta relación estructura-actividad supone una evidencia indirecta de su acción a través de receptores específicos (32). Además, gran cantidad de estudios realiza-

dos con ligandos radiactivos representantes de los diferentes tipos químicos de fármacos BECa (Ej.: ^3H -nitrendipina, ^3H -verapamil y d-cis- ^3H -diltiazem) han permitido establecer que en el canal de Ca^{2+} existen 3 sitios de unión: uno para las dihidropiridinas, otro para los derivados de la papaverina y un tercero para las benzotiazepinas. Estos sitios de unión establecen relaciones alostéricas entre ellos, de modo que, por ejemplo, la unión del verapamil a su sitio inhibe la unión de las dihidropiridinas, mientras que la unión del diltiazem facilita la unión de las dihidropiridinas. El diltiazem y el verapamil se inhiben mutuamente en su unión al receptor del canal de Ca^{2+} (33).

La utilización de estos ligandos radiactivos no solo ha permitido estudiar la localización y densidad de los canales de Ca^{2+} , así como su afinidad por los fármacos BECa (34), sino que además han sido muy útiles como marcadores para aislar y caracterizar bioquímicamente los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes. Aunque el canal se compone de varias subunidades proteicas, denominadas alfa-1, alfa-2, beta, gama y delta, solo una de ellas, alfa-1, ha sido reconocida como portadora de los 3 sitios de unión para los fármacos BECa y como sensor de voltaje del canal (35). La función de las demás subunidades se supone reguladora pero no está realmente esclarecida.

La unión de los fármacos BECa de tipo dihidropiridínico a su receptor en el canal de Ca^{2+} modifica su comportamiento electrofisiológico, siendo esta la base de su acción farmacológica (36). Electrofisiológicamente, el canal de Ca^{2+} se concibe como una puerta con dos estados posibles: abierto y cerrado. La alternancia entre abierto y cerrado se puede producir de 3 modos:

(a) modo 1, caracterizado por aperturas breves (1 ms) en ráfagas rápidas.

(b) modo 2, caracterizado por aperturas relativamente largas (20 ms) y cierres típicamente cortos.

(c) modo 0, caracterizado por el cierre permanente.

Aunque los 3 modos se presenten en ausencia de fármacos, el modo 1 es el más probable, mientras que los fármacos BECa favorecen la permanencia del canal de Ca^{2+} en el modo 0 (36).

Los fármacos BECa muestran selectividad en su efecto, el cual depende del tejido y el estímulo sobre el que actúan. La base de esta selectividad hay que buscarla en las diferencias existentes en el mecanismo de activación de los distintos tejidos y estímulos (17, 19, 26, 37). Estas diferencias se establecen por las siguientes causas:

(a) Dependencia del Ca^{2+} extracelular. Si un estímulo activa un tejido mediante la liberación de Ca^{2+} intracelular, dicha activación no será afectada por los fármacos BECa. Generalmente, la activación de los tejidos es consecuencia de una mezcla entre la entrada de Ca^{2+} extracelular y la liberación de Ca^{2+} intracelular, de modo que la relación entre estas dos fuentes de Ca^{2+} determinará el efecto de los fármacos BECa (37).

(b) Tipo de canales implicados en la entrada de Ca^{2+} extracelular. La entrada de Ca^{2+} se produce a través de canales de dos tipos, los canales dependientes de voltaje (CDV) y los canales dependientes de receptor (CDR). Aunque generalmente los CDV son más sensibles a los BECa que los CDR, esto no es así en algunos tejidos (17, 19). Además, la activación de un tejido por un estímulo puede resultar en el reclutamiento de canales de los dos tipos (CDV y CDR). Por un lado, la despolarización de la membrana celular puede causar la liberación de agonistas que activen CDRs. Por otro lado, la activación con agonistas puede causar un cierto

grado de despolarización que active CDVs (19, 38). En consecuencia, la proporción de los dos tipos de canales que intervengan en la activación del tejido determinará el efecto de los fármacos BECa.

(c) Afinidad de los BECa por los receptores de los canales de Ca^{2+} . La acción de un fármaco BECa depende de su unión a un receptor específico localizado en el propio canal de Ca^{2+} o relacionado funcionalmente con él. Los fármacos BECa se diferencian en grupos químicos muy distintos y su afinidad por los receptores de los canales, en consecuencia, también es variable. En ocasiones, la afinidad de un fármaco BECa por su receptor depende del estado de activación del canal (38).

El uso terapéutico de los fármacos BECa se inició con su administración en enfermedades cardiovasculares (angina de pecho, hipertensión, etc.) debido a su efecto relajante del músculo liso vascular (39). Posteriormente, se ha propuesto la aplicación de los fármacos BECa a otras patologías en las que subyace el espasmo de algún tipo muscular liso, como el control de la motilidad uterina, en el área obstétrico-ginecológica, y el tratamiento del espasmo de las vías respiratorias, en neumología (21).

La selectividad de determinados fármacos BECa por los vasos cerebrales ha sido el argumento utilizado para proponer su uso en enfermedades cerebrovasculares como la isquemia cerebral, la migraña y el vasoespasmo subsiguiente a la hemorragia subaracnoidea (5). No obstante, la etiología de estas enfermedades es compleja y los resultados obtenidos tanto en experimentación animal como en ensayos clínicos no siempre confirman las expectativas terapéuticas de los fármacos BECa en el área cerebrovascular (40-43).

El trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral se ha realizado con el fin de estudiar el efecto de los

fármacos BECa sobre el lecho cerebrovascular. Para ello se han utilizado dos modelos experimentales. El primer modelo experimental consiste en el registro de la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales de cabra aisladas en un baño de órganos. El segundo modelo experimental consiste en la medición electromagnética del flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestesiar.

El plan de trabajo, en líneas generales, se diseñó para estudiar:

- (a) Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales aisladas.
 - (a.1) Importancia del Ca^{2+} extracelular en la contracción de las arterias cerebrales.
 - (a.2) Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales precontraídas.
 - (a.3) Efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de las arterias cerebrales.
- (b) Efecto de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral.
 - (b.1) Efecto "per se" de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral.
 - (b.2) Efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del flujo sanguíneo cerebral.

2.- MATERIAL Y METODOS.

2.1.- MODELO EXPERIMENTAL "IN VITRO": MEDICION DE LA TENSION ISOMETRICA DESARROLLADA POR ARTERIAS CEREBRALES AISLADAS.

2.1.1.- *Preparación experimental y sistema de registro.*

Los experimentos se realizaron con segmentos cilíndricos de arteria cerebral media de cabra. Previa sedación con una inyección intramuscular de 10 mg/kg de Ketolar (clorhidrato de ketamina, Parke Davis), el animal se sacrificó inyectando en la vena yugular 10-15 ml de una solución saturada de KCl. El cráneo se expuso mediante una incisión circular a nivel de la base del cuerno, realizándose una craniectomía parcial con una sierra eléctrica. Una vez descubierto el encéfalo, el cerebro se separó del resto del eje nervioso tras haber retirado la duramadre y seccionado las vías aferentes y eferentes, nerviosas y hemáticas. Inmediatamente se sumergió en solución salina fisiológica fría (0-4°C). Las dos arterias cerebrales medias (ACM) (Figura 4) se disecaron bajo lupa binocular (WILD, Heerbrugg) y se cortaron en segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud.

El registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos de arterias cerebrales aislados en un baño de órganos se realizó siguiendo el método descrito por Nielsen y Owman (44). Básicamente consiste en introducir dos alambres de acero inoxidable finos pero rígidos a través de la luz vascular; uno de ellos está unido a un soporte que, sujeto a la pared del baño, mantiene el segmento arterial en posición horizontal. El otro alambre, en forma de L, se introduce por su lado más corto en la luz vascular, sujetándose por su lado más largo a un transductor de tensión. Por lo tanto, este último alambre puede desplazarse verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor del segmento vascular en respuesta a los cambios de tensión que se produ-

cen en la pared arterial (Figura 5). El tiempo máximo empleado en el montaje de la preparación fue de 30 minutos.

El baño de órganos contiene 5 ml de solución Ringer-Locke burbujeada continuamente con una mezcla gaseosa de O₂ (95%) y CO₂ (5%) que le confiere un pH de 7.3-7.4. Un circuito de agua caliente que rodea exteriormente a las cubetas, mantiene una temperatura constante en el líquido nutritivo de 37.0±0.5°C. Además se dispone de una reserva de solución Ringer-Locke, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en el que se hallan inmersas las arterias.

El sistema de registro consta de un transductor de tensión ("Universal Transducing Cell" UC3, Gould Statham), una microescala accesoria (UL5, Gould Statham), un tornillo micrométrico ("Micrometer Boss Head", Bioscience), un amplificador de tensión (Hewlett-Packard 8805C) y un registrador (Omniscribe, Houston, mod. D 5237-5).

Mediante la rotación del tornillo micrométrico se aplicó una tensión pasiva a los segmentos de 1 g. Dado que la respuesta inmediata de los mismos es la de relajarse, la tensión debe reajustarse periódicamente. El líquido nutritivo se renovó cada 15 minutos aproximadamente. Una vez estabilizada la tensión (60-90 min) se iniciaron los experimentos.

2.1.2.- *Procedimiento experimental.*

Las curvas dosis-efecto se obtuvieron acumulativamente, de forma que la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis es la resultante de la suma de esta última con las dosis administradas anteriormente. Una dosis se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo. Cuando se trata de poner de manifiesto el

efecto relajante de un fármaco se procede de la misma forma, pero induciendo previamente una tensión activa con un agente vasoconstrictor capaz de mantener la tensión el tiempo suficiente para realizar la curva dosis-efecto. Para el estudio de la inhibición de la respuesta contráctil, los segmentos arteriales se incubaron con el antagonista o medio sin Ca^{2+} durante 20 minutos antes de realizar la curva dosis-efecto del estímulo contráctil. Dado que la posible inhibición se estudió en el mismo segmento arterial en que se obtuvo la respuesta control, algunos experimentos se dedicaron a estudiar una posible pérdida espontánea de sensibilidad del tejido sin mediar tratamiento farmacológico alguno. El volumen total de fármacos añadido al baño no superó en ningún caso el 10% del volumen del líquido del baño. Después de cada curva se renovó repetidamente la solución nutritiva, dejando transcurrir 45-60 minutos antes de realizar una nueva curva dosis-efecto.

2.1.3.- *Fármacos y soluciones.*

En la Tabla 1 se muestra una lista de los compuestos y fármacos utilizados, con su procedencia.

El CaCl_2 se disolvió (1M) y diluyó en solución salina (NaCl 0.9%). El KCl se disolvió (2M) en solución salina.

La noradrenalina (NA) se disolvió (10^{-2}M) y diluyó en solución salina con ácido ascórbico (0.01%) para evitar su oxidación. La 5-hidroxitriptamina (5-HT) se disolvió (10^{-2}M) y diluyó en solución salina. La prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) se disolvió (10^{-2}M) en etanol y se diluyó en solución salina.

La nicardipina se disolvió (10^{-2}M) en agua bidestilada, necesitando de agitación vigorosa y aplicación de ultrasonidos (Ultrasounds, Selecta), y se diluyó en solución salina.

La nimodipina se obtuvo disuelta (0.02%) en etanol/polietilenglicol y se diluyó en solución salina. El manejo de la nimodipina, así como los experimentos en que se utilizó dicho fármaco, se realizaron bajo la iluminación de una lámpara de vapor de sodio (Philips XRX-601) para evitar su fotodegradación. El verapamil se obtuvo en solución acuosa (0.25%) y se diluyó en solución salina.

La solución nutritiva de Ringer-Locke tiene la siguiente composición: NaCl, 120mM; KCl, 5.4mM; CaCl₂, 2.2mM; MgCl₂, 1.0mM; NaHCO₃, 25mM; glucosa, 5.6mM. Se preparó una solución concentrada (20x) de cloruros y se diluyó en el momento de su uso, añadiendo el NaHCO₃ y la glucosa. El pH se ajustó a 7.3-7.4 con HCl diluido y se mantuvo con la mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). El medio sin Ca²⁺ se preparó con la composición anterior pero omitiendo el CaCl₂. También se utilizó medio sin Ca²⁺ al que se añadió EGTA (1mM) como quelante del Ca²⁺ residual.

2.1.4.- *Protocolo experimental.*

La importancia del Ca²⁺ extracelular en la contracción de la ACM se investigó obteniendo la curva dosis-efecto del CaCl₂ (10⁻⁶ -10⁻²M) en medio normal, en medio sin Ca²⁺ y en medio sin Ca²⁺ despolarizante (KCl, 100mM). Además, se compararon las curvas dosis-efecto para el KCl (20-120mM), la NA (10⁻⁸-10⁻⁴M), la 5-HT (10⁻⁸-3x10⁻⁵M) y la PGF_{2α} (10⁻⁶-3x10⁻⁵M) obtenidas en medio normal con las obtenidas en medio sin Ca²⁺ y en medio sin Ca²⁺ al que se adicionó EGTA (1mM). La incubación en medio sin Ca²⁺ consistió en 3 lavados de la ACM con dicho medio, separados por dos intervalos de 10 minutos.

El efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de la ACM se analizó de dos modos:

(a) Se realizaron curvas dosis-efecto para la nicardipina (10^{-10} - 10^{-4} M), nimodipina (10^{-10} - 10^{-6} M) y verapamil (10^{-9} - 10^{-4} M) en segmentos arteriales previamente contraídos con KCl (100mM) o $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-5} M).

(b) Se compararon las curvas dosis-efecto para el CaCl_2 (10^{-6} - 10^{-2} M), el KCl (20-120mM), la NA (10^{-8} - 10^{-4} M), la 5-HT (10^{-8} - 3×10^{-5} M) y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-7} - 3×10^{-5} M) obtenidas en medio normal con las obtenidas tras incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina o verapamil a diferentes dosis (10^{-10} - 10^{-4} M).

2.1.5.- *Análisis de los resultados.*

Los efectos contráctiles se expresaron como porcentaje del efecto máximo ($E_{\text{máx}}$) obtenido en condiciones control. Los efectos relajantes se expresaron como porcentaje de la tensión activa de partida. La dosis efectiva media (ED_{50}) se calculó mediante una proporción entre el efecto y el valor absoluto del logaritmo de la dosis.

Cada experimento se repitió en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Se calcularon los efectos medios con el error estandar de la media (EEM) y las ED_{50} medias con los límites de confianza del 95% (C.L. 95%). Para los cálculos con la ED_{50} se manejó siempre el valor absoluto del logaritmo, que se ajusta a una distribución normal (45).

Los valores de las curvas dosis-efecto se graficaron expresados como $\text{media} \pm \text{EEM}$, mientras que en las tablas aparecen los valores medios de ED_{50} y $E_{\text{máx}}$. La comparación estadística de los valores de ED_{50} y $E_{\text{máx}}$ se realizó con un análisis de la varianza (ANOVA) seguido, si resultó procedente, de un test de Newman-Keuls (46). Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$.

2.2.- MODELO EXPERIMENTAL "IN VIVO": MEDICION DEL FLUJO SANGUINEO CEREBRAL EN LA CABRA SIN ANESTESIAR.

2.2.1.- *Consideraciones anatómicas y fisiológicas acerca del lecho vascular cerebral de la cabra.*

La cabra es el animal de elección en nuestras investigaciones por las especiales disposiciones anatómicas y características fisiológicas de su circulación cerebral (47, 48), que permiten medir el flujo sanguíneo de un hemisferio cerebral sin contaminación por flujo sanguíneo extracerebral, cuando se sigue el procedimiento quirúrgico que más adelante se describe (49).

La arteria maxilar interna, rama de la arteria carótida externa, proporciona el flujo sanguíneo total para cada hemisferio cerebral a través de la rete mirabile, compacta red de arterias que se anastomosan entre sí y que se sitúa en el seno cavernoso a ambos lados de la hipófisis. Este aporte sanguíneo procedente de la arteria maxilar interna llega a la rete mirabile a través de dos ramas principales: el ramo anastomótico, que se une a la rete en sus porciones lateral y posterior, y la arteria anastomótica, que se une a la rete en su porción anterior. Las arterias oftálmica, etmoidal y buccinatoria tienen su origen distalmente a la arteria anastomótica, mientras que la arteria dental lo tiene proximalmente; todas ellas constituyen la fuente principal del flujo sanguíneo extracerebral aportado por la arteria carótida externa. En la cabra las arterias vertebrales no contribuyen al aporte sanguíneo cerebral puesto que no comunican con la arteria basilar. Además, no existen carótidas internas extracraneales, quedando sólo como unos vestigios de las mismas que comunican la rete mirabile con el polígono de Willis. Este polígono se diferencia del humano en que la sangre que circula por la arteria basilar fluye en dirección caudal. Todas estas particularidades anatómicas se han confirmado mediante el modelado del árbol

vascular de la cabeza de la cabra con un polímero acrílico y mediante arteriografías (49, 50).

Aunque anatómicamente la rete mirabile representa un alto grado de comunicación entre ambos hemisferios cerebrales, en condiciones normales la sangre de un lado no pasa al otro, y sólo tras la oclusión de la arteria maxilar interna de un lado la sangre se distribuye por ambos hemisferios cerebrales. Este hecho se ha demostrado mediante la inyección de macroagregados de albúmina marcada radiactivamente en la arteria maxilar interna: en condiciones normales el isótopo se distribuye exclusivamente por el hemisferio correspondiente al lado donde se ha efectuado la inyección; tras la oclusión de la arteria maxilar interna contralateral el isótopo aparece en ambos hemisferios (49).

2.2.2.- Técnica quirúrgica: preparación vascular para la medición del flujo sanguíneo cerebral y de la presión arterial.

La técnica que a continuación pasamos a describir tiene como objetivos la eliminación del flujo sanguíneo que, circulando por la arteria maxilar interna, va a irrigar tejidos extracerebrales, así como la implantación de un transductor electromagnético de flujo alrededor de la arteria maxilar interna, un catéter para la inyección de fármacos en la arteria temporal y un ocluser mecánico de vasos alrededor de la arteria carótida externa.

Todas las intervenciones se realizaron en condiciones estériles y con el animal en ayunas. Previa sedación con una inyección intramuscular de ketamina (10 mg/kg), se canaliza la vena safena y se induce la anestesia administrando lentamente una solución de tiopental sódico al 2%. Rápidamente se produce la desaparición de reflejos, una marcada relajación muscular y la parada respiratoria que permite y requiere la

intubación. Tras la intubación traqueal y gástrica se mantiene la ventilación asistida con un respirador (ATM, Logic 03A) que suministra una mezcla de halotano al 1.5% en oxígeno. Los parámetros ventilatorios son: frecuencia respiratoria 10-15 ciclos/min, volumen ventilatorio 5-7 litros/min y presión de insuflación 20-30 cm H₂O.

La exposición de la arteria maxilar interna se lleva a cabo mediante una incisión a lo largo del ramo mandibular izquierdo y posterior separación por disección roma de la glándula parótida. A continuación se procede a la desinserción parcial del músculo masetero y la resección de la pequeña porción de la mandíbula que cubre a la arteria maxilar interna en el origen de la arteria dental y del ramo anastomótico. El nervio facial, que cruza el campo operativo, se respeta en todos los casos.

Una vez expuesta la arteria maxilar interna se procede a su ligadura distalmente al origen del ramo anastomótico y a la ligadura de la arteria dental. Sin embargo, esta maniobra no es suficiente para eliminar el flujo sanguíneo extracerebral que pasa por las arterias oftálmica, etmoidal y buccinatoria, las cuales reciben de nuevo su aporte sanguíneo como consecuencia del flujo retrógrado que, debido a la caída de presión en la arteria maxilar interna después de la ligadura, se establece desde la rete mirabile a través de la arteria anastomótica (51). Dado que por su localización anatómica estas arterias no pueden ser expuestas quirúrgicamente, para su oclusión se inyectan 1-2000 unidades N.I.H. (National Institute of Health) de trombina disueltas en 1 ml de solución salina fisiológica en la arteria maxilar interna, en sentido craneal, inmediatamente distal a la ligadura realizada previamente. Así se produce una obliteración inmediata de estos vasos que priva al ojo de su irrigación normal, con lo cual aparece una ceguera ipsilateral secundaria. No obstante, la circulación colateral parece ser sufi-

ciente para evitar la necrosis de las partes blandas de la cara.

Para medir el flujo sanguíneo de un hemisferio cerebral se implanta un transductor electromagnético de flujo, previamente calibrado, en la arteria maxilar interna, inmediatamente antes del origen del ramo anastomótico. Para que la medición sea correcta se debe retirar cuidadosamente la adventicia, dejando la superficie exterior del vaso limpia y uniforme, y asegurarse de que el vaso está ajustado al transductor en todo momento (52).

La inyección o infusión de fármacos directamente en la circulación cerebral se realiza a través de un catéter introducido en la arteria temporal, el cual se mantiene permeable con inyecciones periódicas de una solución salino-heparina.

Para la determinación del flujo cero se coloca un ocluser mecánico de vasos alrededor de la arteria carótida externa proximalmente a la arteria temporal. El ocluser consiste básicamente en un hilo de nylon en forma de lazo que rodea a la arteria sobre una superficie de silicona. A su vez, este hilo se halla enfundado en todo su trayecto excepto en la zona de contacto con la arteria, para que su desplazamiento no irrite la zona intervenida. Los extremos del hilo van unidos a una pieza tope con la cual se pueden modificar las dimensiones del lazo y, por tanto, de la arteria, pudiéndose llegar hasta la completa oclusión de la misma.

Los terminales del transductor, del ocluser y del catéter se dirigen subcutáneamente y se fijan en la base del cuerno, quedando así dispuestos crónicamente para la realización de los experimentos en el animal despierto. La sutura se realiza por planos según la técnica habitual, procediendo

a continuación a la aplicación tópica de un antiséptico para evitar la infección de la herida.

Para el registro de la presión arterial sistémica se implanta un catéter en la arteria femoral. El terminal de este catéter se lleva a través de un túnel subcutáneo y se fija en la parte posterior de la pata con puntos de seda. Como medida preventiva, después de la intervención se inyectan 1.200.000 unidades de penicilina por vía intramuscular.

2.2.3.- Procedimiento experimental.

Los experimentos se realizaron en el animal despierto, totalmente recuperado de la intervención quirúrgica, con parámetros cardiorrespiratorios estables y colocado en una plataforma portátil especialmente diseñada para que pueda adoptar su posición estática natural. Una plancha de metacrilato con un orificio adaptado al cuello del animal impide el movimiento de marcha. En la mayoría de los casos los experimentos se iniciaron al segundo o tercer día tras la intervención quirúrgica. Aunque lo habitual es que el animal permanezca tranquilo y no manifieste signos de incomodidad durante la administración de fármacos y la oclusión de la arteria carótida externa, el experimento se interrumpió siempre que se apreciaron síntomas de excitación o de irritabilidad, devolviéndose el animal al estabulario y dejando transcurrir al menos 24 horas antes de intentar un nuevo experimento.

El registro del flujo sanguíneo cerebral se realizó conectando el transductor electromagnético de flujo (Carolina Medical Electronics) implantado en la arteria maxilar interna a un medidor electromagnético de flujo (Carolina Medical Electronics mod. 501), y éste a su vez a un amplificador bioeléctrico Hewlett-Packard 8802A. La presión arterial sistémica se obtuvo a partir del catéter introducido

en la arteria femoral conectado a un transductor de presión Hewlett-Packard 1280C y éste a su vez a un amplificador de presión Hewlett-Packard 8805C. La frecuencia cardíaca se obtuvo mediante un tacómetro Hewlett-Packard 7807C a partir de la onda pulsátil del flujo sanguíneo cerebral o de la presión arterial. El flujo sanguíneo cerebral (pulsátil y medio), la presión arterial y la frecuencia cardíaca se registraron continuamente en un polígrafo Hewlett-Packard 7758A. La resistencia vascular cerebral se calculó como el cociente entre la presión arterial sistémica en mm Hg, y el flujo sanguíneo cerebral en ml/min por 100 g de tejido. Durante los experimentos se tomaron muestras de sangre arterial a partir del catéter femoral para la determinación de pH, pCO₂ y pO₂ en un analizador de gases (ABL 2, Radiometer).

Los fármacos se inyectaron generalmente a través del catéter localizado en la arteria temporal, de modo que pasan directamente a la arteria maxilar interna y, con ello, a la circulación cerebral. En ocasiones, se inyectaron fármacos por vía intravenosa, utilizando un catéter implantado en la vena safena. El vehículo utilizado fue siempre 1ml de solución salina, realizándose a continuación una inyección de 1ml de solución salina para arrastrar el fármaco que pudiese quedar en el catéter. Inyecciones control del vehículo no produjeron modificaciones en el FSC ni otros parámetros hemodinámicos. La infusión de fármacos en la arteria maxilar interna se realizó siempre con un flujo de 1ml/min, adecuando la concentración de fármaco en la solución salina para obtener la dosis de infusión deseada. Se utilizó una bomba de infusión de flujo constante Hoeschst PP50.

Las curvas dosis-efecto de los fármacos sobre el FSC se obtuvieron de forma no acumulativa. Se dejó transcurrir el tiempo suficiente para que desapareciese el efecto de una dosis antes de inyectar una dosis superior. Para el estudio de la inhibición de la respuesta vasoconstrictora, se inyec-

taron dosis del fármaco vasoconstrictor antes y durante la infusión continua del fármaco bloqueante.

2.2.4.- *Fármacos y soluciones.*

En la Tabla 1 se muestra una lista de los fármacos utilizados, con su procedencia.

La nicardipina se disolvió (1mg/ml) en agua bidestilada y se diluyó en solución salina (NaCl 0.9%). La nifedipina se disolvió (1mg/ml) en etanol y se diluyó en solución salina. La nimodipina se obtuvo disuelta (0.02%) en etanol/polietilenglicol y se diluyó en solución salina. El manejo de la nifedipina y la nimodipina, así como los experimentos en que se utilizaron dichos fármacos, se realizaron bajo la iluminación de una lámpara de vapor de sodio (Philips XRX-601) para evitar su fotodegradación. El verapamil se obtuvo en solución acuosa (0.25%) y se diluyó en solución salina.

La noradrenalina (NA) se disolvió (1mg/ml) y diluyó en solución salina con ácido ascórbico (0.01%) para evitar su oxidación. La 5-hidroxitriptamina se disolvió (1mg/ml) y diluyó en solución salina. La prostaglandina F_{2α} se disolvió (10⁻²M) en etanol y se diluyó en solución salina.

2.2.5.- *Protocolo experimental.*

El efecto "per se" de los fármacos BECa sobre el FSC se analizó obteniendo la curva dosis-efecto (10-100 µg) para la nicardipina, nifedipina, nimodipina y verapamil inyectadas en la arteria maxilar interna. Paralelamente se registraron la presión arterial y la frecuencia cardíaca, y se tomaron muestras de sangre arterial para determinación del pH, pCO₂ y pO₂. También se investigó el efecto de la inyec-

ción intravenosa de fármacos BECa sobre el FSC y otros parámetros hemodinámicos.

La reducción farmacológica del FSC se produjo inyectando NA (0.1-10 μg), 5-HT (0.1-10 μg) y $\text{PGF}_2\alpha$ (3-100 μg) en la arteria maxilar interna. El efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del FSC se investigó inyectando NA (3 μg), 5-HT (10 μg) y $\text{PGF}_2\alpha$ (30 μg) durante la infusión de nicardipina, nifedipina, nimodipina o verapamil (10, 20 ó 100 $\mu\text{g}/\text{min}$).

2.2.6.- *Análisis de los resultados.*

En cada cabra se realizaron varios experimentos en diferentes días, y los resultados se promediaron para ser considerados como un solo dato. Cada experimento se repitió en varias cabras y a partir de los resultados se calculó la media aritmética, la desviación típica y el error estandar de la media (EEM). Los valores medios de incremento o reducción porcentual del FSC se graficaron en función de la dosis, mientras que en las tablas se expresaron los valores absolutos de FSC, presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia vascular cerebral, pH, pCO_2 y pO_2 . El análisis estadístico se hizo aplicando el test de Student para datos pareados. Una probabilidad menor del 5% se consideró estadísticamente significativa.

3.- RESULTADOS

3.1.- *Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales aisladas.*

3.1.1.- *Importancia del Ca^{2+} extracelular en la contracción de las arterias cerebrales.*

3.1.1.1.- *Efecto del $CaCl_2$ sobre las arterias cerebrales.*

La adición de dosis acumulativas de $CaCl_2$ (10^{-6} - $10^{-2}M$) al baño no causó cambios en la tensión isométrica de la arteria cerebral media (ACM), ni en medio normal, ni en medio sin Ca^{2+} . En cambio, cuando se despolarizaron previamente las arterias con KCl (100mM) en medio sin Ca^{2+} , la adición de $CaCl_2$ (10^{-6} - $10^{-2}M$) produjo contracción dosis-dependiente de la ACM (Figura 6) con una $ED_{50}=7.4(5.6-9.8)\times 10^{-4}M$ y un $Emáx=2154\pm 197mg$.

3.1.1.2.- *Contracción de las arterias cerebrales en medio sin Ca^{2+} .*

3.1.1.2.1.- *Contracción con KCl.*

La adición de dosis acumulativas de KCl (20-120mM) al baño con medio normal causó contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de la ACM en medio sin Ca^{2+} inhibió significativamente la contracción con KCl, causando reducción en el $Emáx$, así como incremento de la ED_{50} . La incubación de la ACM en medio sin Ca^{2+} al que se adicionó EGTA (1mM) produjo inhibición significativa de la contracción con KCl, causando también reducción del $Emáx$ e incremento de la ED_{50} , pero sin diferencia significativa con la incubación en medio sin Ca^{2+} y sin EGTA (Figura 7 y Tabla 2).

3.1.1.2.2.- *Contracción con noradrenalina.*

La adición de dosis acumulativas de noradrenalina (NA, 10^{-8} - 10^{-4} M) al baño con medio normal causó contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de la ACM en medio sin Ca^{2+} inhibió significativamente la contracción con NA, produciendo reducción del Emáx sin cambio significativo en la ED₅₀. Cuando la incubación de la ACM se realizó en medio sin Ca^{2+} al que se adicionó EGTA (1mM), la inhibición de la contracción con NA fue similar a la inhibición en medio sin Ca^{2+} (Figura 8 y Tabla 2).

3.1.1.2.3.- *Contracción con 5-hidroxitriptamina.*

La adición de dosis acumulativas de 5-hidroxitriptamina (5-HT, 10^{-8} - 3×10^{-5} M) al baño con medio normal produjo contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación en medio sin Ca^{2+} inhibió significativamente la contracción con 5-HT causando reducción del Emáx sin modificación de la ED₅₀. La incubación en medio sin Ca^{2+} al que se añadió EGTA (1mM) produjo inhibición de la contracción significativamente mayor que en el medio sin Ca^{2+} , con reducción en el Emáx e incremento en la ED₅₀ (Figura 9 y Tabla 2).

3.1.1.2.4.- *Contracción con prostaglandina F_{2α}.*

La adición de dosis acumulativas de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}, 10^{-6} - 3×10^{-5} M) al baño con medio normal produjo contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de la ACM en medio sin Ca^{2+} inhibió significativamente la contracción con PGF_{2α}, causando reducción en el Emáx sin modificación de la ED₅₀. Cuando la incubación de la ACM se realizó en medio sin Ca^{2+} al que se añadió EGTA (1mM), la inhibición de la contracción con PGF_{2α} fue significativamente mayor,

con una reducción más acusada del Em_{áx} pero con mantenimiento de la ED₅₀ (Figura 10 y Tabla 2).

3.1.1.2.5.- *Comparación de los diferentes estímulos contráctiles.*

Al comparar los cuatro estímulos contráctiles utilizados (Figura 11), la 5-HT fue el estímulo menos afectado por el medio sin Ca²⁺, siguiéndole la PGF_{2α}, el KCl y la NA. Sin embargo, cuando se añadió EGTA (1mM) al medio sin Ca²⁺, la NA fue el estímulo más afectado y no hubo distinción entre la 5HT, la PGF_{2α} y el KCl.

3.1.2.- *Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales precontraídas.*

3.1.2.1.- *Precontracción con KCl.*

La adición de una dosis única de KCl (100mM) al baño produjo contracción mantenida de la ACM (2142±191mg). En estas condiciones, la adición de dosis acumulativas de nicardipina (10⁻¹⁰-10⁻⁵M), nimodipina (10⁻¹⁰-10⁻⁶M) y verapamil (10⁻⁹-10⁻⁴M) causó relajación dosis-dependiente de la ACM (Figura 12). Los tres fármacos BECa tuvieron un efecto relajante máximo (Em_{áx}) alrededor del 90% de la tensión activa alcanzada con el KCl, sin diferencia significativa entre ellos. Por contra, los valores de la ED₅₀ fueron significativamente diferentes para cada fármaco BECa, estableciéndose el siguiente orden de potencia relajante: nimodipina > nicardipina > verapamil (Tabla 3).

3.1.2.2.- Precontracción con prostaglandina $F_{2\alpha}$.

La adición de una dosis única de $PGF_{2\alpha}$ ($10^{-5}M$) al baño causó contracción mantenida de la ACM ($1602 \pm 139mg$). En estas condiciones, la adición de dosis acumulativas de nicardipina (3×10^{-9} - $10^{-4}M$), nimodipina (10^{-9} - $10^{-6}M$) y verapamil (10^{-8} - $10^{-4}M$) produjo relajación dosis-dependiente de la ACM (Figura 13). El efecto relajante máximo ($Emáx$) fue significativamente diferente para cada uno de los fármacos BECa, estableciéndose el siguiente orden de eficacia: nicardipina > nimodipina > verapamil. En cuanto a los valores de la ED_{50} , no hubo diferencia significativa entre la nicardipina y el verapamil, estableciéndose el siguiente orden de potencia relajante: nimodipina > nicardipina = verapamil (Tabla 3). Como ejemplo, en la Figura 14 se muestra un registro representativo de este tipo de experimento, en el que se aprecia el mantenimiento de la contracción con $PGF_{2\alpha}$, así como el efecto relajante de las dosis acumulativas de nicardipina.

3.1.3.- Efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de las arterias cerebrales.

3.1.3.1.- Contracción con $CaCl_2$.

La despolarización de la ACM con KCl (100mM) en medio sin Ca^{2+} produjo contracción de los segmentos arteriales cuya magnitud fue aproximadamente un 20% de la contracción causada en medio normal (Figura 7). En estas condiciones, la adición de dosis acumulativas de $CaCl_2$ (10^{-6} - $10^{-2}M$) produjo contracción dosis-dependiente de la ACM (Figura 15).

La incubación de la ACM con nicardipina ($10^{-8}M$) produjo inhibición significativa de la contracción con $CaCl_2$ (Figura 15), con reducción en el $Emáx$ e incremento de la ED_{50} . Cuando se incrementó la dosis de nicardipina ($10^{-6}M$) la

inhibición de la contracción con CaCl_2 no fue significativamente mayor (Tabla 4).

La incubación con nimodipina (10^{-10}M) causó inhibición significativa de la contracción con CaCl_2 , reduciéndose el Emáx y aumentando la ED_{50} . Con una dosis de nimodipina superior (10^{-8}M), la inhibición fue significativamente mayor en cuanto a la reducción del Emáx del CaCl_2 (Figura 16 y Tabla 4).

La incubación con verapamil a las dosis utilizadas para la nicardipina y la nimodipina (10^{-10}M y 10^{-8}M) no afectó a la contracción de la ACM con CaCl_2 . Una dosis de verapamil mayor (10^{-6}M) sí produjo inhibición significativa de la contracción (Figura 17), con reducción en el Emáx e incremento de la ED_{50} (Tabla 4).

3.1.3.2.- Contracción con KCl .

La adición de dosis acumulativas de KCl (20-120mM) al baño causó contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de los segmentos arteriales con nicardipina (10^{-10}M) produjo inhibición significativa de la contracción con KCl , con reducción en el Emáx pero sin modificar la ED_{50} . Una dosis superior de nicardipina (10^{-8}M) causó inhibición significativamente mayor, con reducción en el Emáx e incremento en la ED_{50} (Figura 18 y Tabla 5).

La incubación de la ACM con nimodipina (10^{-10}M) inhibió significativamente la contracción con KCl , reduciendo el Emáx pero sin modificar la ED_{50} . Dicha inhibición fue significativamente mayor cuando la dosis de nimodipina se incrementó 100 veces (10^{-8}M), produciéndose reducción más acusada del Emáx e incremento de la ED_{50} (Figura 19 y Tabla 5).

La incubación de la ACM con verapamil (10^{-10}M) produjo inhibición significativa de la contracción con KCl, reduciendo el Emáx pero manteniendo la ED₅₀. Dicha inhibición fue significativamente menor que la producida por la misma dosis de nicardipina y nimodipina. La incubación con dosis mayores de verapamil (10^{-8}M y 10^{-6}M) conllevó un incremento significativo y dosis-dependiente de la inhibición de la respuesta contráctil al KCl, con reducción en el Emáx e incremento en la ED₅₀ (Figura 20 y Tabla 5).

3.1.3.3.- Contracción con noradrenalina.

La adición de dosis acumulativas de NA (10^{-8} - 10^{-4}M) al baño produjo contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de los segmentos arteriales con nicardipina (10^{-7}M) produjo inhibición significativa de la contracción con NA, con reducción tanto del Emáx como de la ED₅₀ (Figura 21 y Tabla 6).

La incubación de la ACM con nimodipina (10^{-7}M) produjo inhibición de la contracción con NA (Figura 22) similar a la causada por la nicardipina, mientras que el verapamil (10^{-6}M) produjo inhibición significativa de la contracción (Figura 23), con reducción en el Emáx pero sin modificación de la ED₅₀ (Tabla 6).

3.1.3.4.- Contracción con 5-hidroxitriptamina.

La adición de 5-HT al baño en dosis acumulativas (10^{-8} - $3 \times 10^{-5}\text{M}$) produjo contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de los segmentos arteriales con nicardipina (10^{-7}M) no inhibió la contracción con 5-HT. Tuvo que incrementarse la dosis de nicardipina (10^{-5}M) para que se produjese inhibición significativa de dicha contracción, con

reducción del Em_{áx} y sin modificación en la ED₅₀ (Figura 24 y Tabla 7).

En cambio, la incubación de la ACM con nimodipina (10^{-7}M) inhibió significativamente la contracción con 5-HT (Figura 25), sin modificación de la ED₅₀ y con reducción del Em_{áx} similar a la producida por la nicardipina (10^{-5}M) (Tabla 7). En la Figura 26 se muestra un registro representativo de este tipo de experimento, en el que se aprecia la contracción dosis-dependiente de la ACM con 5-HT, así como la inhibición de dicha contracción con nimodipina (10^{-7}M).

La incubación de la ACM con verapamil (10^{-5}M) inhibió significativamente la contracción con 5-HT (Figura 27), reduciendo el Em_{áx} e incrementando ostensiblemente la ED₅₀ (Tabla 7). El registro de la Figura 28 muestra un ejemplo representativo de este tipo de experimento. La inhibición de la respuesta a la 5-HT causada por el verapamil (10^{-5}M) incluye un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-efecto que la diferencia de la inhibición de este mismo estímulo contráctil producida por la nicardipina y la nimodipina.

3.1.3.5.- Contracción con prostaglandina $F_{2\alpha}$.

La adición de dosis acumulativas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-7} - $3 \times 10^{-5}\text{M}$) al baño provocó contracción dosis-dependiente de la ACM. La incubación de los segmentos arteriales con nicardipina (10^{-8}M) produjo inhibición significativa de la respuesta contráctil a la $\text{PGF}_{2\alpha}$, con reducción del Em_{áx} y de la ED₅₀. Dosis superiores de nicardipina (10^{-6}M y 10^{-4}M) mostraron la dosis-dependencia de dicha inhibición, con reducción progresiva del Em_{áx} y mantenimiento de la ED₅₀ (Figura 29 y Tabla 8).

La incubación de la ACM con nimodipina (10^{-8}M) inhibió significativamente la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$, causando reducción del Emáx sin cambio de la ED_{50} . Cuando se incrementó la dosis de nimodipina (10^{-6}M), la inhibición de la respuesta contráctil a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue significativamente mayor, con reducción más acusada del Emáx e incremento de la ED_{50} (Figura 30 y Tabla 8). La Figura 31 muestra un registro representativo de este tipo de experimento, en el que se aprecia, por un lado, la dosis-dependencia de la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$ y, por otro lado, su inhibición también dosis-dependiente con nimodipina.

La incubación de la ACM con verapamil (10^{-8}M) no inhibió la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$. Cuando se incrementó la dosis de verapamil (10^{-6}M y 10^{-4}M) sí se produjo inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil a la $\text{PGF}_{2\alpha}$, con reducción progresiva del Emáx y sin modificación de la ED_{50} (Figura 32 y Tabla 8).

3.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral (FSC).

3.2.1.- Efecto "per se" de los fármacos BECa sobre el FSC.

La inyección de nicardipina (10-100 μg) en la arteria maxilar interna causó incremento dosis-dependiente del flujo sanguíneo cerebral (FSC) (Figura 33), sin cambio significativo en presión arterial ni frecuencia cardíaca. Como aparece en la Tabla 9, el incremento del FSC causado por la nicardipina (100 μg) se asocia con una reducción significativa en la resistencia vascular cerebral. No se detectaron cambios significativos en el pH, pCO_2 y pO_2 arteriales durante el incremento del FSC provocado por la nicardipina.

La inyección de nifedipina (10-100 μg) en la arteria maxilar interna produjo incremento dosis-dependiente del FSC

(Figura 34), sin modificación significativa de la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. En la Figura 35 aparece un registro de los cambios producidos en el FSC pulsátil, FSC medio, presión arterial y frecuencia cardíaca por una dosis de 50 μg de nifedipina. Los valores de incremento en el FSC y reducción en la resistencia vascular cerebral alcanzados con la dosis de 100 μg de nifedipina (Tabla 10) fueron similares a los producidos por la misma dosis de nicardipina. La inyección de nifedipina tampoco produjo cambios significativos en el pH, pCO_2 y pO_2 arteriales durante el incremento del FSC.

La inyección de nimodipina (10-100 μg) en la arteria maxilar interna incrementó de modo dosis-dependiente el FSC (Figura 36), sin cambio significativo de la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. En la Tabla 11 aparece el incremento en el FSC causado por la nimodipina (100 μg), el cual se asocia a una reducción en la resistencia vascular cerebral. Los valores de pH, pCO_2 y pO_2 arteriales no variaron significativamente incluso con la dosis de 100 μg de nimodipina (Tabla 12), la cual tuvo el mayor efecto sobre FSC de todos los fármacos BECa utilizados.

La inyección de verapamil (10-100 μg) en la arteria maxilar interna provocó incremento dosis-dependiente del FSC (Figura 37) sin cambios significativos en la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. En la Tabla 13 se observa como la dosis máxima de verapamil empleada (100 μg) causa incremento en el FSC junto con reducción en la resistencia vascular cerebral. Durante el incremento del FSC no se apreciaron modificaciones de los valores de pH, pCO_2 y pO_2 arteriales.

Las diferencias en el incremento de FSC causado por los fármacos BECa utilizados se aprecia mejor a dosis bajas (10 μg) que a dosis altas (100 μg). A dosis bajas se establece el siguiente orden de potencia vasodilatadora: nimodi-

pina > nifedipina > nicardipina > verapamil. En cambio, a dosis altas tan sólo destaca la nimodipina del resto de fármacos BECa por su efecto vasodilatador (Figura 38).

Cuando los fármacos BECa se inyectaron por vía intravenosa, el incremento de FSC causado fue menor que con la inyección intraarterial directa al lecho cerebrovascular. Además, se pudo observar una ligera pero significativa caída en la presión arterial acompañada de taquicardia compensatoria. En la Tabla 14 aparecen los efectos de la inyección i.v. de nifedipina (500 µg) sobre el FSC y otros parámetros hemodinámicos. Dichos efectos pueden apreciarse también en el registro de la Figura 39.

3.2.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del FSC.

3.2.2.1.- Reducción del FSC con noradrenalina.

La inyección de NA (0.1-10 µg) en la arteria maxilar interna produjo reducción dosis-dependiente del FSC (Figura 40) sin cambios significativos en presión arterial ni frecuencia cardíaca. Tan sólo la administración de la dosis más alta de NA (10 µg) produjo aumento de la presión arterial a los 15 segundos de la inyección, resultado de los efectos sistémicos del fármaco tras su paso por el lecho vascular cerebral. No se apreciaron modificaciones significativas en los valores de pH, pCO₂ y pO₂ arteriales durante la reducción del FSC causada por la NA.

La infusión intraarterial de nicardipina (10, 100 µg/min) produjo incremento dosis-dependiente del FSC. Durante la infusión de nicardipina, la reducción del FSC causada por la NA (3 µg) fue significativamente menor que antes de la infusión y dependiente de la dosis de nicardipina infundida (Figura 41 y Tabla 15).

La infusión intraarterial de nifedipina y nimodipina (10 µg/min) produjeron incremento del FSC. Durante la infusión de nifedipina y nimodipina, la reducción del FSC provocada por la NA (3 µg) fue significativamente menor que antes de la infusión (Tabla 16).

La infusión intraarterial de verapamil (10, 20 µg/min) produjo incremento dosis-dependiente del FSC. Durante la infusión de verapamil, la reducción del FSC causada por la NA (3 µg) fue significativamente menor que antes de la infusión, dependiendo de la dosis de verapamil infundida (Figura 42 y Tabla 17).

La comparación del efecto inhibidor de los fármacos BECa utilizados sobre la reducción del FSC producida por la NA mostró el siguiente orden de potencia: nimodipina > nifedipina > nicardipina > verapamil (Figura 43).

3.2.2.2.- Reducción del FSC con 5-hidroxitriptamina.

La inyección de 5-HT (0.1-10 µg) en la arteria maxilar interna produjo reducción dosis-dependiente del FSC (Figura 44), sin cambios significativos en la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. Tampoco se apreciaron modificaciones significativas en los valores de pH, pCO₂ y pO₂ arteriales durante la reducción del FSC causada por la 5-HT.

La infusión intraarterial de nicardipina (10, 100 µg/min) produjo incremento dosis-dependiente del FSC. Durante la infusión de nicardipina se inhibió de manera dosis-dependiente la reducción del FSC causada por la 5-HT (10 µg) (Figura 45 y Tabla 18).

La infusión intraarterial de nifedipina y nimodipina (10 µg/min) causaron incremento del FSC. Durante la adminis-

tracción de nifedipina y nimodipina, la reducción del FSC producida por la 5-HT (10 μ g) fue significativamente menor que antes de la infusión (Tabla 19).

La infusión intraarterial de verapamil (10, 20 μ g/min) provocó incremento significativo del FSC. Durante la infusión de verapamil (10 μ g/min) no se produjo modificación significativa de la reducción del FSC con 5-HT (10 μ g). Al incrementar la dosis de verapamil (20 μ g/min) sí se produjo inhibición significativa de dicha reducción (Tabla 20).

Al comparar el efecto inhibitor de los fármacos BECa utilizados sobre la reducción del FSC con 5-HT se dedujo el siguiente orden de potencia: nimodipina > nifedipina = nicardipina > verapamil (Figura 46).

3.2.2.3.- Reducción del FSC con prostaglandina $F_{2\alpha}$.

La inyección de $PGF_{2\alpha}$ (3-100 μ g) en la arteria maxilar interna produjo reducción dosis-dependiente del FSC (Figura 47), sin modificación significativa en la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. Tampoco se detectaron cambios significativos en los valores de pH, pCO_2 y pO_2 arteriales durante la reducción del FSC causada por la $PGF_{2\alpha}$.

La infusión intraarterial de nicardipina y nimodipina (10 μ g/min) produjeron incremento significativo del FSC. Durante la infusión de nicardipina y nimodipina, la reducción del FSC causada por la $PGF_{2\alpha}$ (30 μ g) fue significativamente menor que antes de la infusión (Tabla 21).

La infusión intraarterial de verapamil (10 μ g/min) no modificó significativamente ni el FSC ni su reducción con $PGF_{2\alpha}$ (30 μ g). Tuvo que incrementarse 10 veces la dosis de infusión de verapamil (100 μ g/min) para obtener incremento

significativo del FSC, así como inhibición de la reducción del FSC producida con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (30 μg) (Figura 48 y Tabla 21).

La comparación del efecto inhibitor de los fármacos BECa utilizados sobre la reducción del FSC con $\text{PGF}_{2\alpha}$ mostró el siguiente orden de potencia: nimodipina = nicardipina > verapamil (Figura 49).

En la Tabla 22 se resume la capacidad inhibitoria de los diferentes fármacos BECa utilizados sobre la reducción farmacológica del FSC con NA, 5-HT y $\text{PGF}_{2\alpha}$.

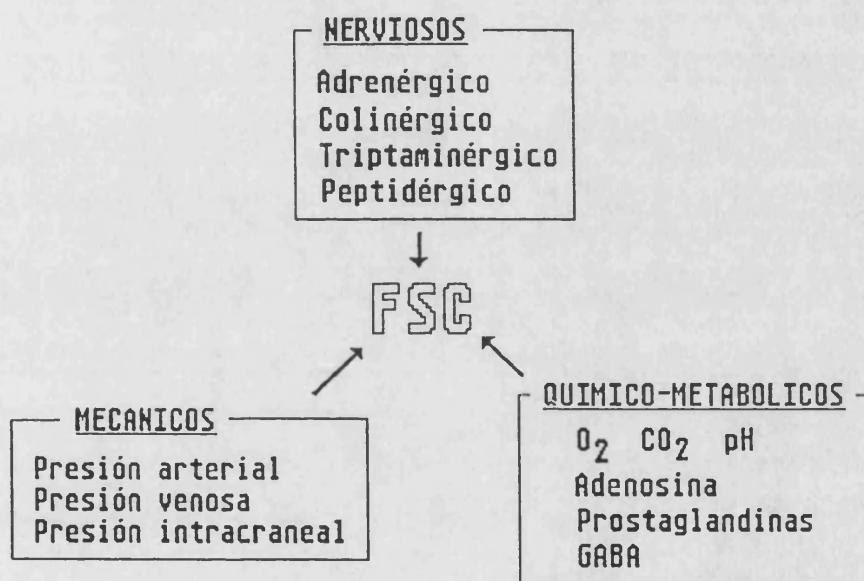


FIGURA 1.- Factores que regulan el flujo sanguíneo cerebral (FSC).

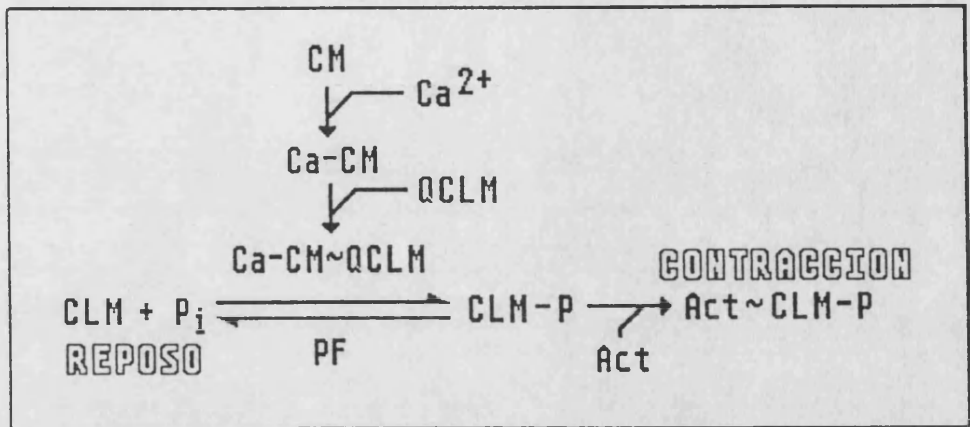
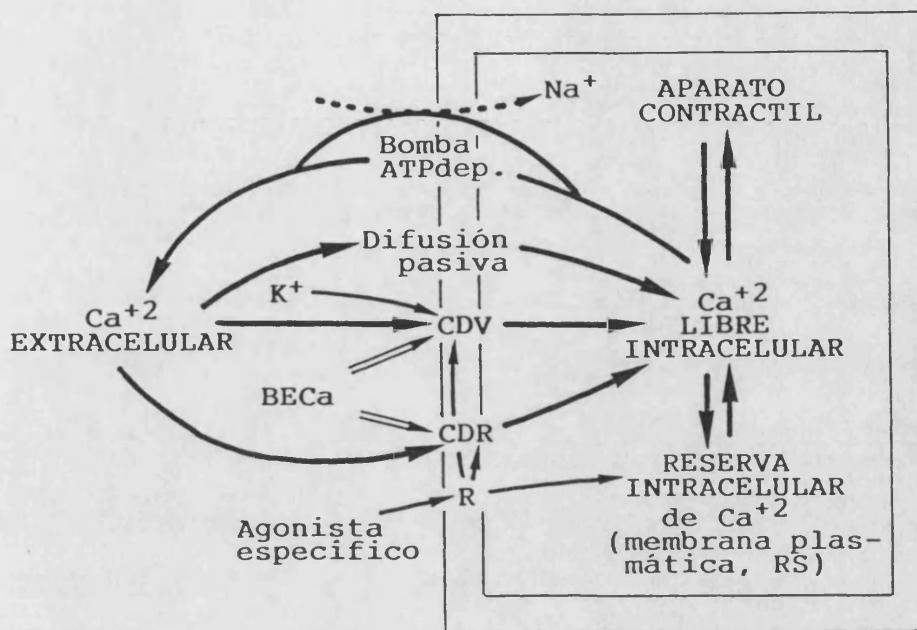


FIGURA 2.- Mecanismo de activación por el Ca^{2+} de los miofilamentos del músculo liso. Ca^{2+} : calcio iónico; CM: calmodulina; QCLM: quinasa de la cadena ligera de la miosina; PF: protein-fosfatasa; CLM: cadena ligera de la miosina; P_i : fosfato inorgánico; Act: actina.



R= receptor; CDV= canal dependiente de voltaje
 RS= reticulo sarcoplásmico; CDR= canal dependiente de receptor
 BECa= bloqueante de la entrada de Ca^{2+}

FIGURA 3.- Flujos de Ca^{2+} durante la activación del músculo liso vascular y lugares de acción de los fármacos BECa.

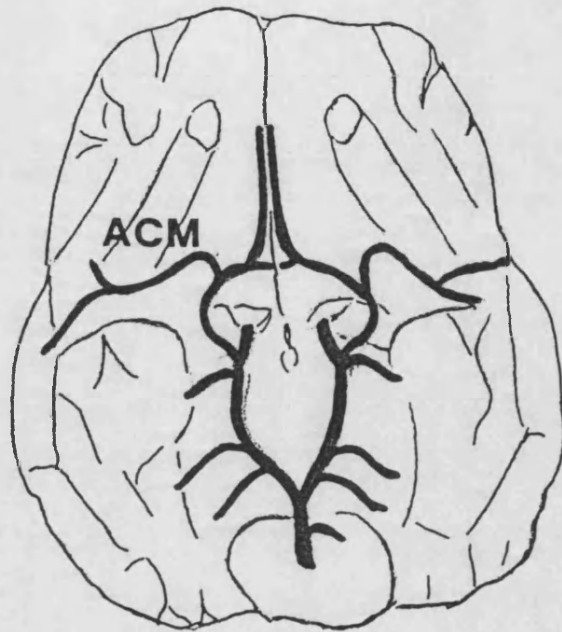


FIGURA 4.- Arterias de la base del cerebro de la cabra. Localización de la arteria cerebral media (ACM), utilizada en nuestros experimentos.

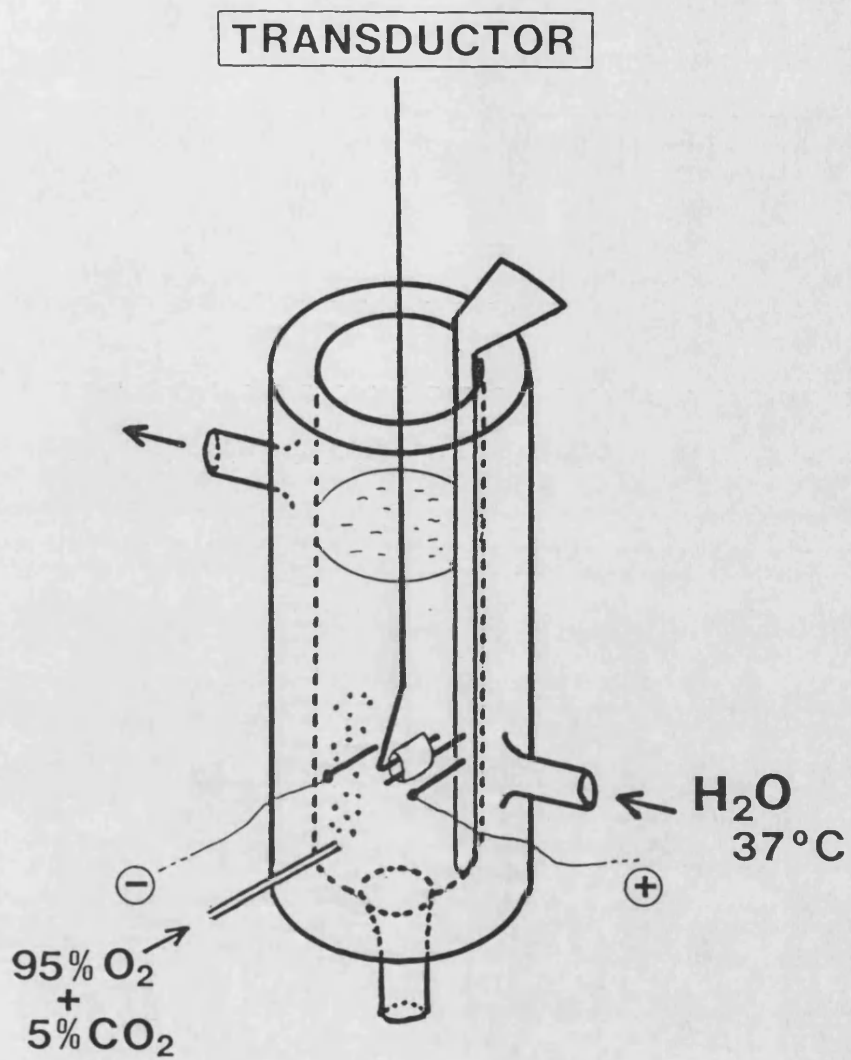


FIGURA 5.- Disposición del segmento cilíndrico de arteria cerebral media (ACM) en el baño de órganos para el registro de tensión isométrica.

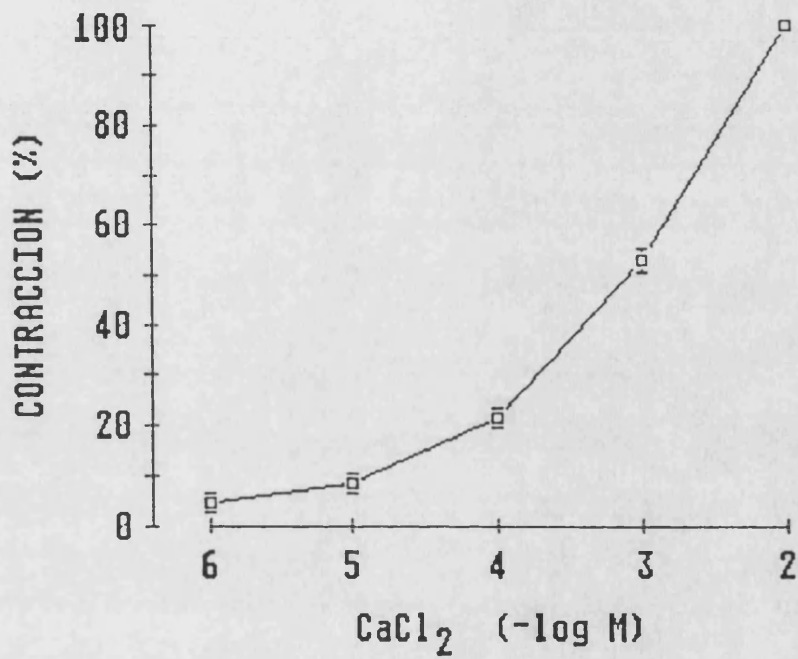


FIGURA 6.- Curva dosis-efecto del CaCl₂ sobre la ACM despolarizada (KCl 100mM) en medio sin Ca²⁺. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx y representan la media±EEM de 6 determinaciones.

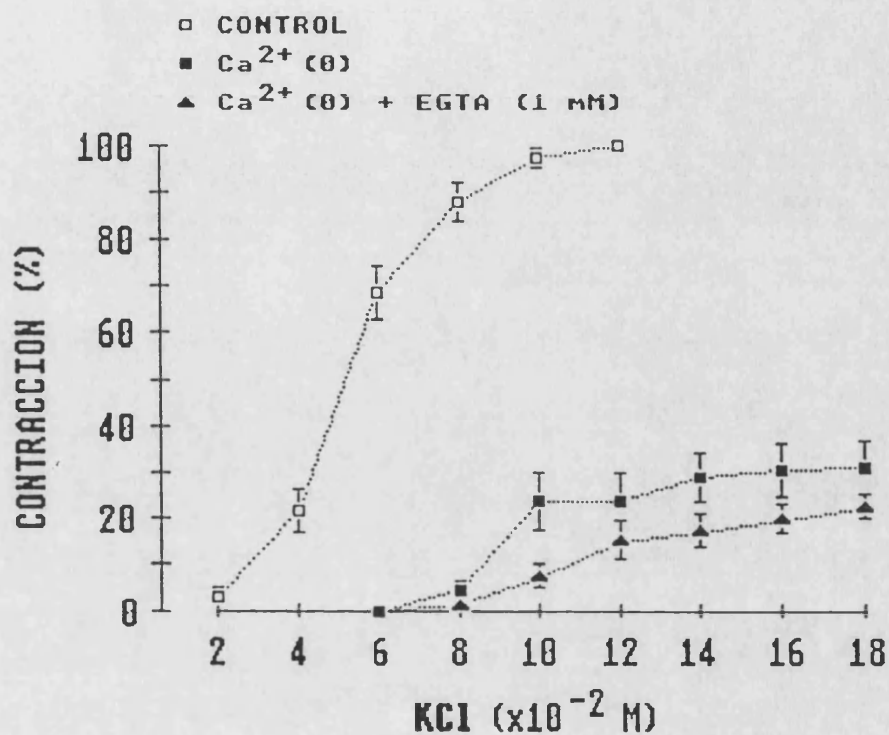


FIGURA 7.- Curva dosis-efecto del KCl sobre la ACM en medio normal (control), en medio sin Ca²⁺ (Ca²⁺(0)) y en medio sin Ca²⁺ al que se adicionó EGTA 1mM (Ca²⁺(0)+EGTA). Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

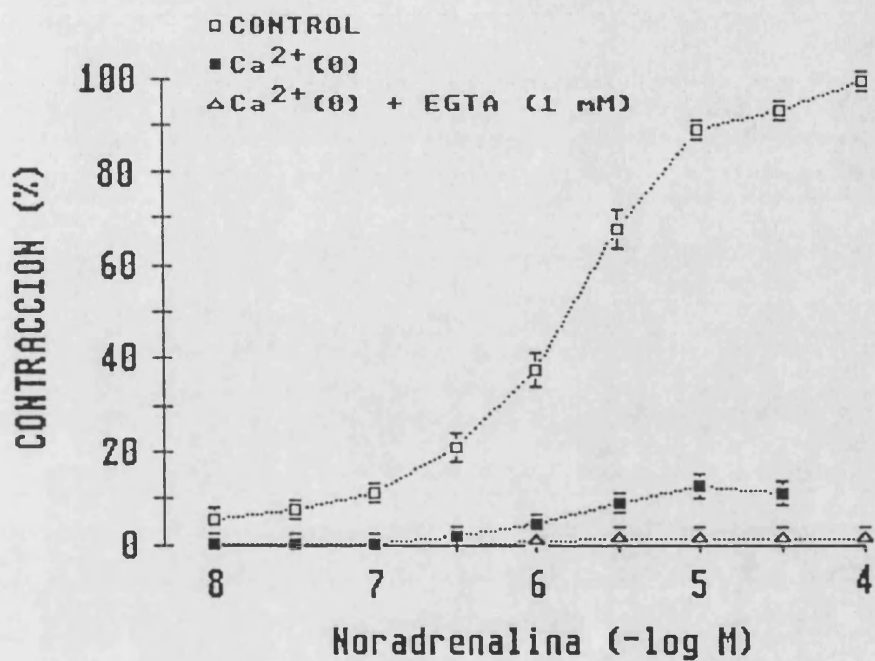


FIGURA 8.- Curva dosis-efecto de la noradrenalina sobre la ACM en medio normal (control), en medio sin Ca²⁺ (Ca²⁺(0)) y en medio sin Ca²⁺ al que se adicionó EGTA 1mM (Ca²⁺(0)+EGTA). Los datos se expresan como porcentaje del E_{máx} control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

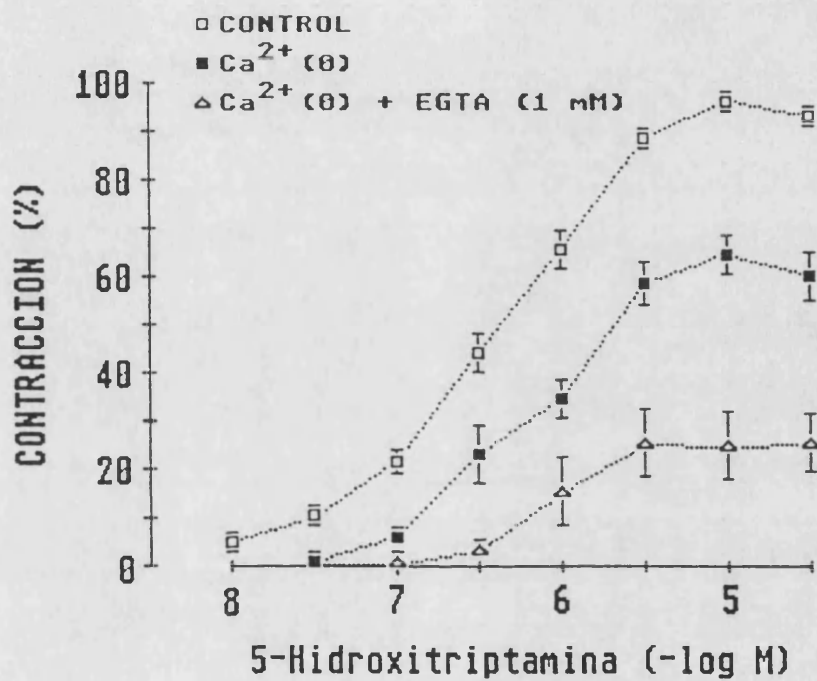


FIGURA 9.- Curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina sobre la ACM en medio normal (control), en medio sin Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}(0)$) y en medio sin Ca^{2+} al que se adicionó EGTA 1mM ($\text{Ca}^{2+}(0)+\text{EGTA}$). Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

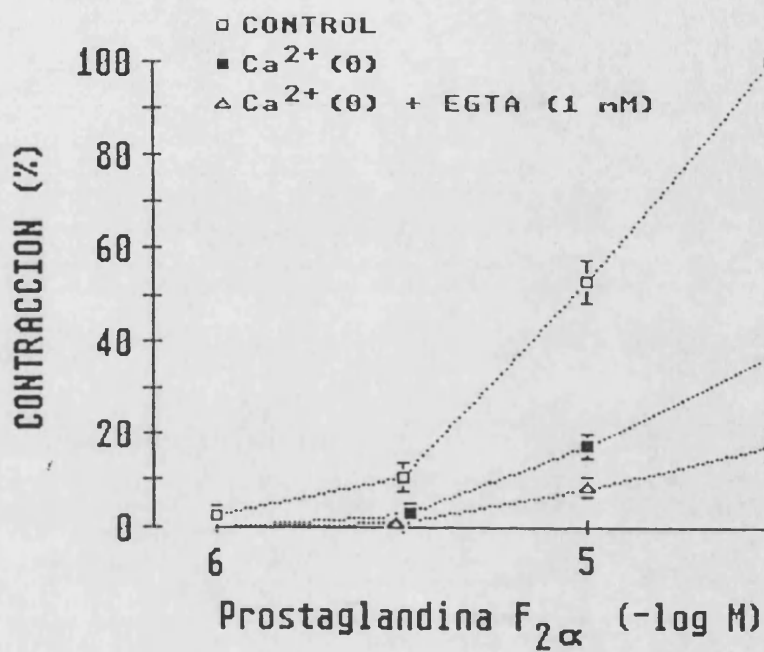


FIGURA 10.- Curva dosis-efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre la ACM en medio normal (control), en medio sin Ca^{2+} ($Ca^{2+}(0)$) y en medio sin Ca^{2+} al que se adicionó EGTA 1mM ($Ca^{2+}(0)+EGTA$). Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 8 determinaciones.

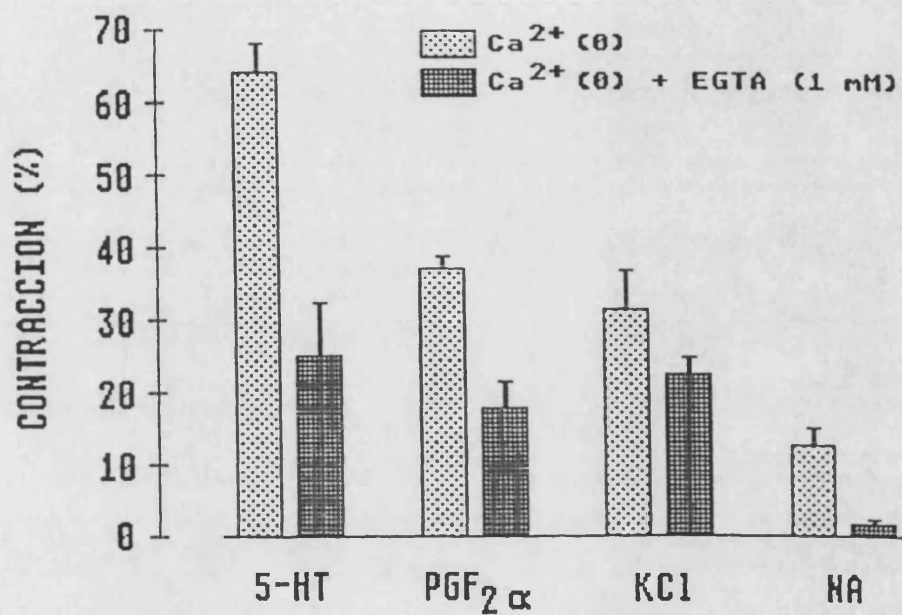


FIGURA 11.- Comparación de los valores de Emáx alcanzados por la ACM tras su estimulación con 5-hidroxitriptamina (5-HT), prostaglandina F₂α (PGF₂α), KCl y noradrenalina (NA) en medio sin Ca²⁺ (Ca²⁺(0)) y en medio sin Ca²⁺ al que se adicionó EGTA 1mM (Ca²⁺(0)+EGTA). Los datos se expresan como porcentaje del Emáx en medio normal y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

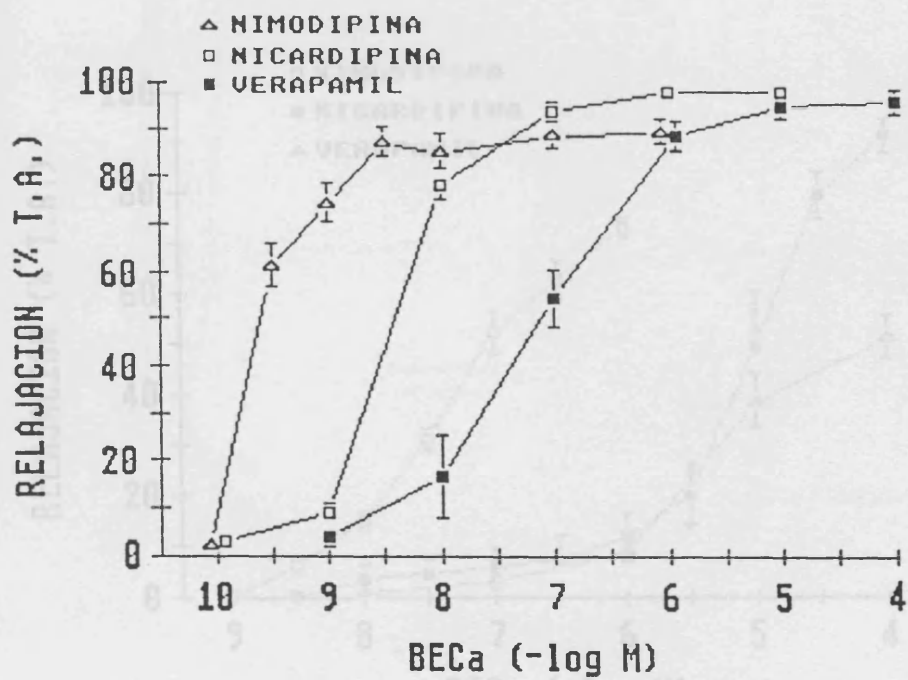


FIGURA 12.- Curvas dosis-efecto de la nicardipina, nimodipina y verapamil sobre la ACM precontraída con KCl (100mM). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión activa de partida y representan la media \pm EEM de 9 determinaciones.

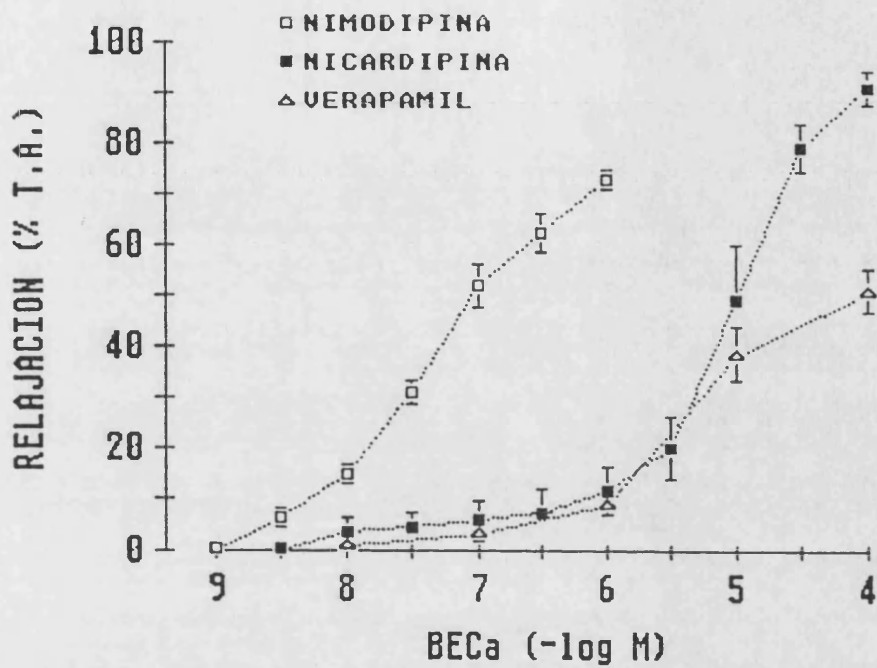


FIGURA 13.- Curvas dosis-efecto de la nicardipina, nimodipina y verapamil sobre la ACM precontraída con prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($10^{-5}M$). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión activa de partida y representan la media \pm EEM de 9 determinaciones.

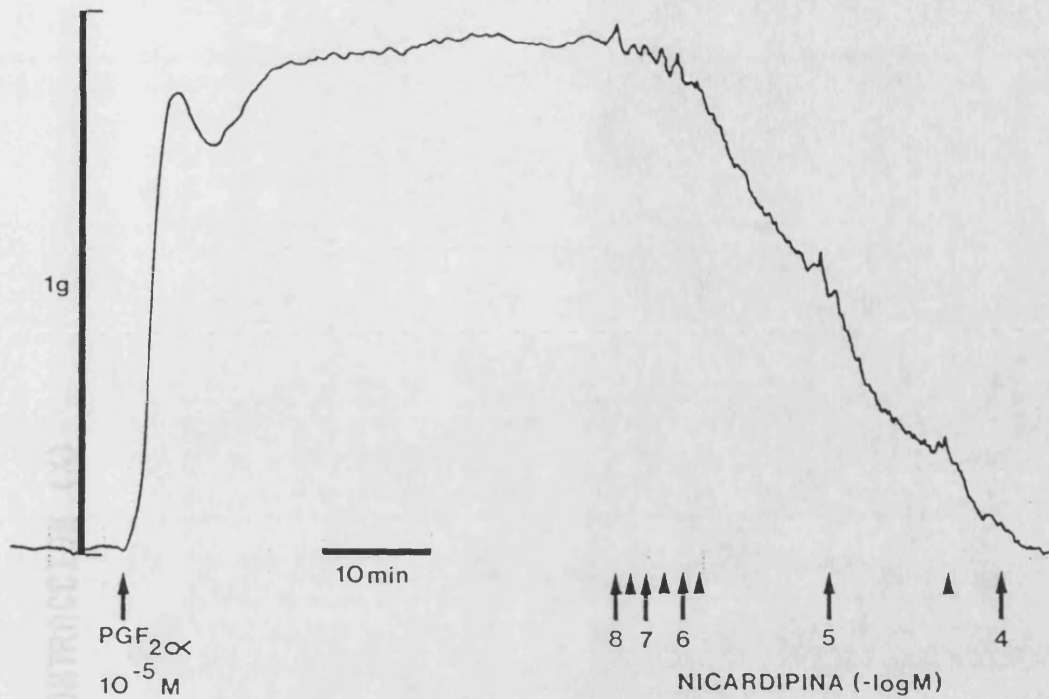


FIGURA 14.- Registro representativo de la relajación dosis-dependiente causada por la nicardipina en la ACM precontraída con prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}).

FIGURA 15.- Efecto de la nicardipina (NIC) en la actividad eléctrica (EC) control y durante la expresión de la actividad eléctrica (EA) de las células de

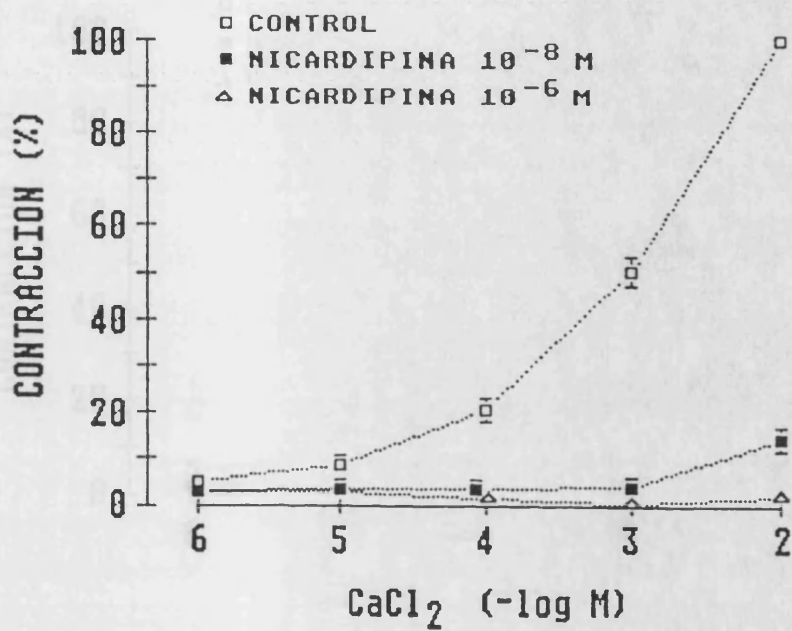


FIGURA 15.- Curva dosis-efecto del CaCl_2 sobre la ACM despolarizada (KCl 100mM) en medio sin Ca^{2+} , en condiciones control y durante incubación con nicardipina. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{\text{máx}}$ control y representan la media \pm EEM de 6 determinaciones.

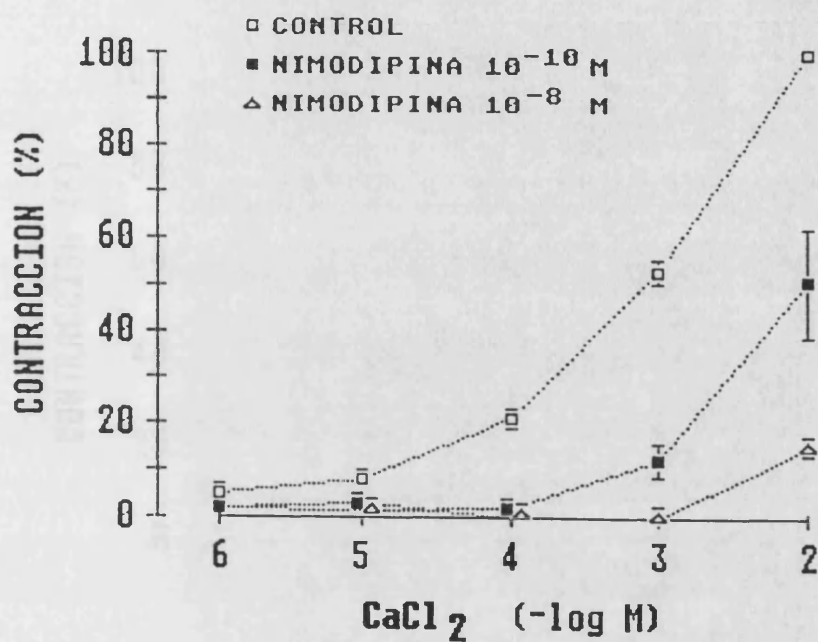


FIGURA 16.- Curva dosis-efecto del CaCl_2 sobre la ACM despolarizada (KCl 100mM) en medio sin Ca^{2+} , en condiciones control y durante incubación con nimodipina. Los datos se expresan como porcentaje del Emax control y representan la media \pm EEM de 6 determinaciones.

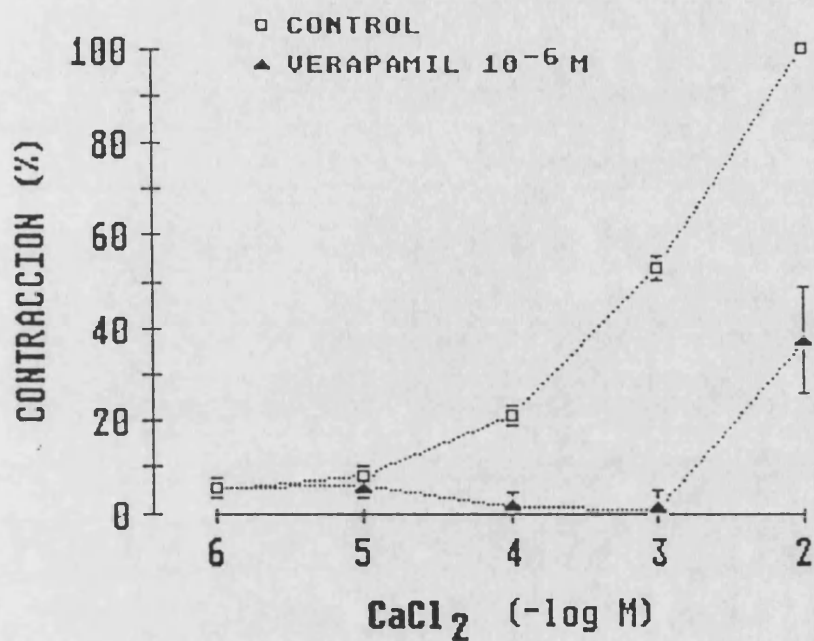


FIGURA 17.- Curva dosis-efecto del CaCl₂ sobre la ACM despolarizada (KCl 100mM) en medio sin Ca²⁺, en condiciones control y durante incubación con verapamil. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 6 determinaciones.

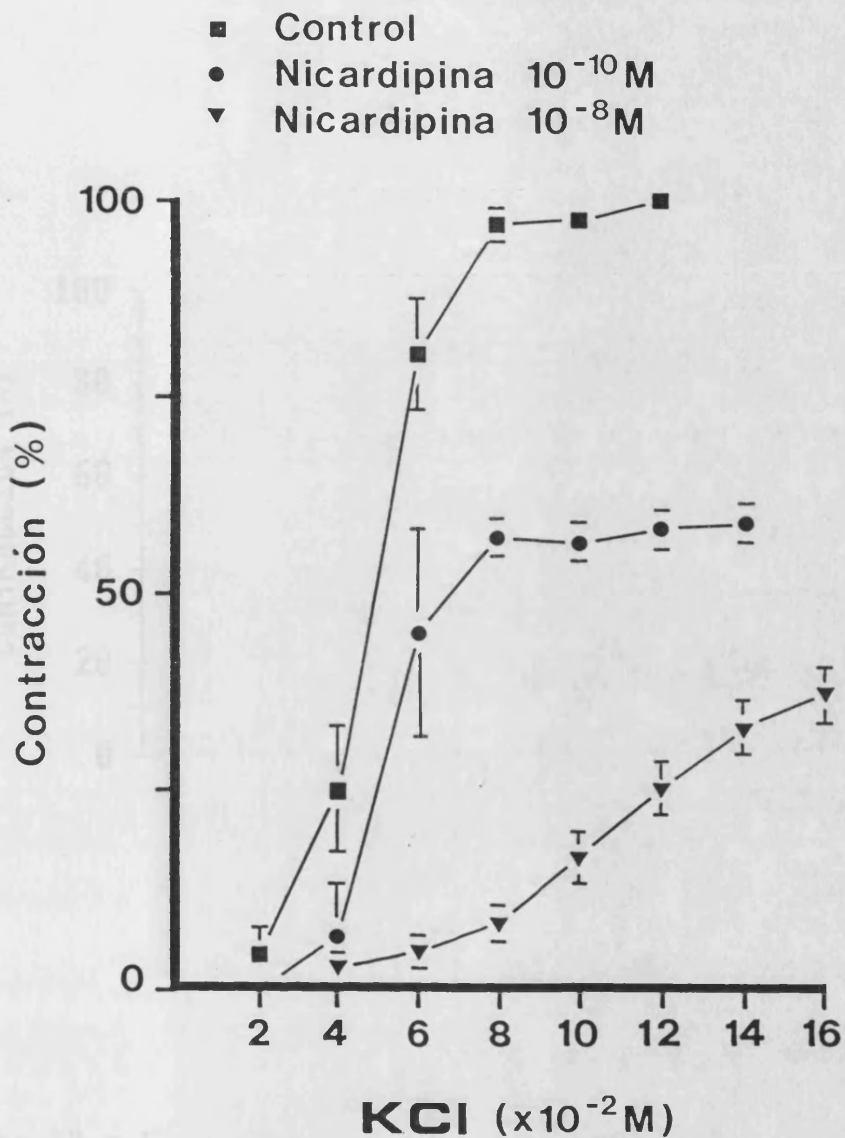


FIGURA 18.- Curva dosis-efecto del KCl sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nicardipina. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 10 determinaciones.

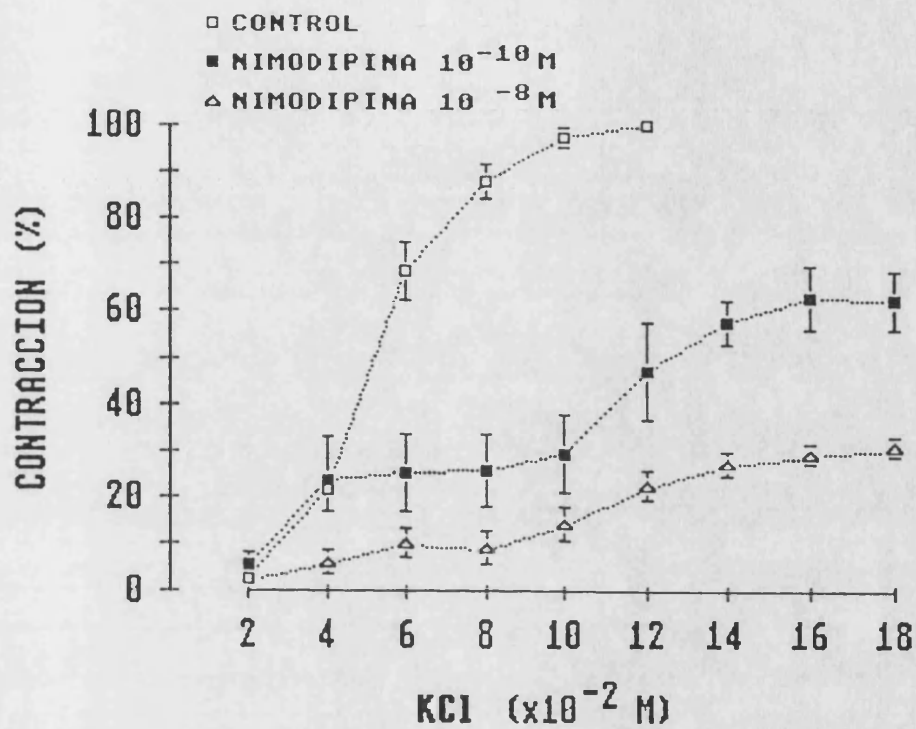


FIGURA 19.- Curva dosis-efecto del KCl sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nimodipina. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 10 determinaciones.

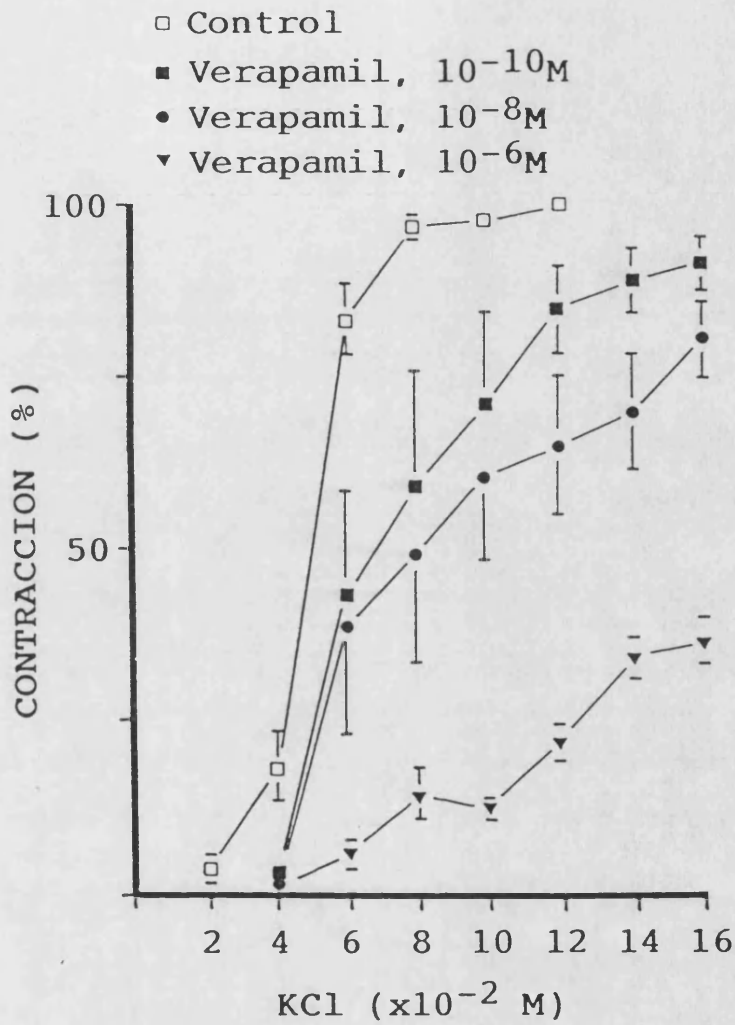


FIGURA 20.- Curva dosis-efecto del KCl sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con verapamil. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la $media \pm EEM$ de 10 determinaciones.

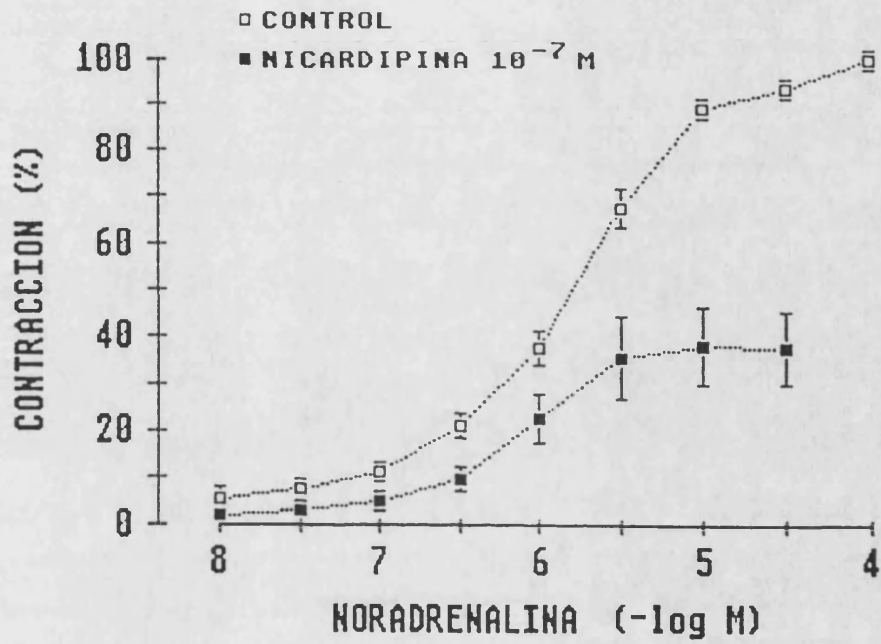


FIGURA 21.- Curva dosis-efecto de la noradrenalina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nicardipina. Los datos se expresan como porcentaje del E_{máx} control y representan la media ± EEM de 8 determinaciones.

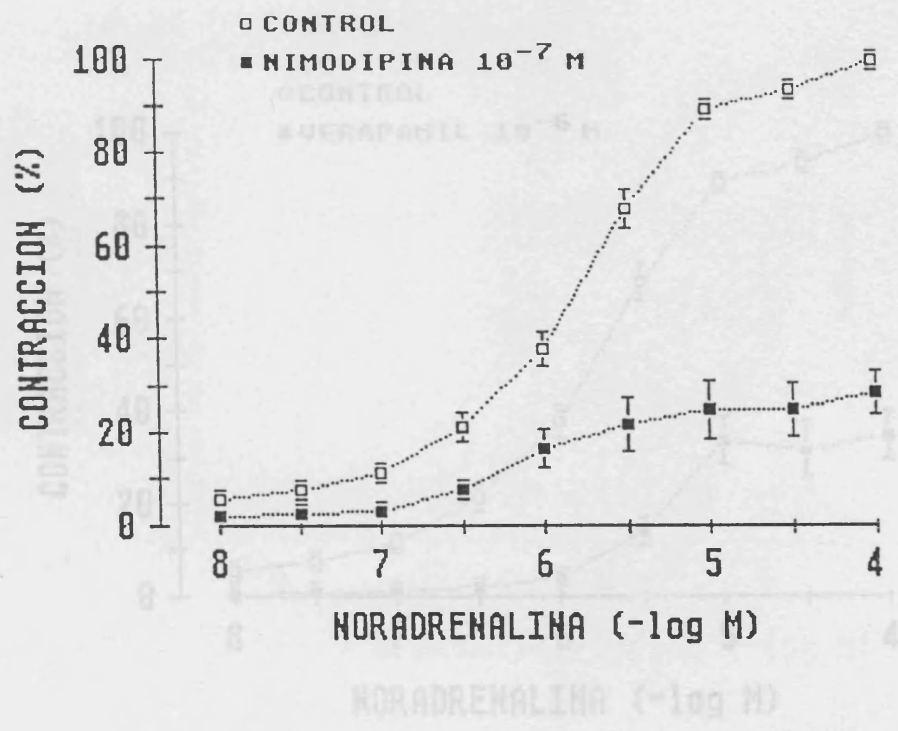


FIGURA 22.- Curva dosis-efecto de la noradrenalina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nimodipina. Los datos se expresan como porcentaje del Em_{ax} control y representan la media ± EEM de 8 determinaciones.

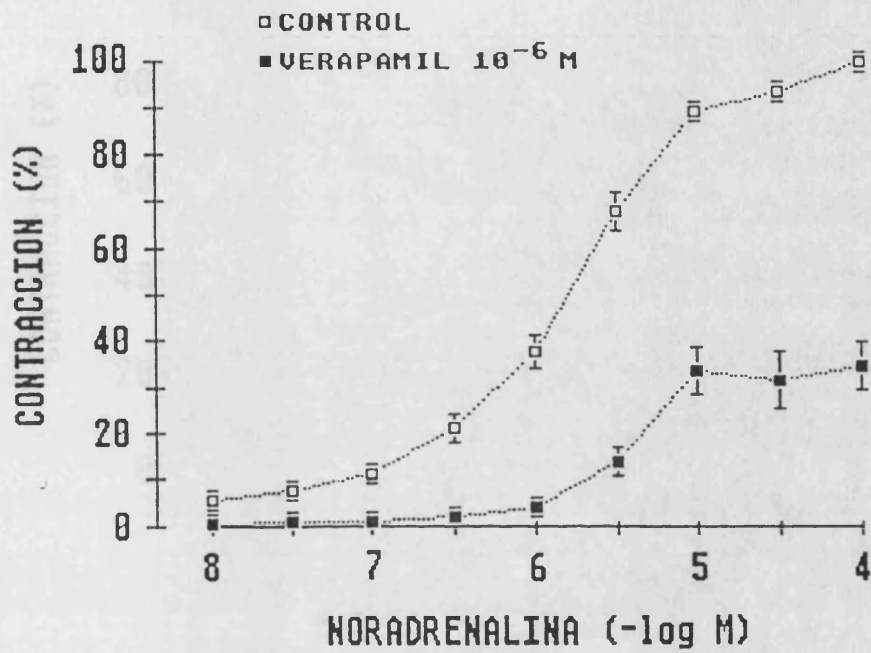


FIGURA 23.- Curva dosis-efecto de la noradrenalina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con verapamil. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

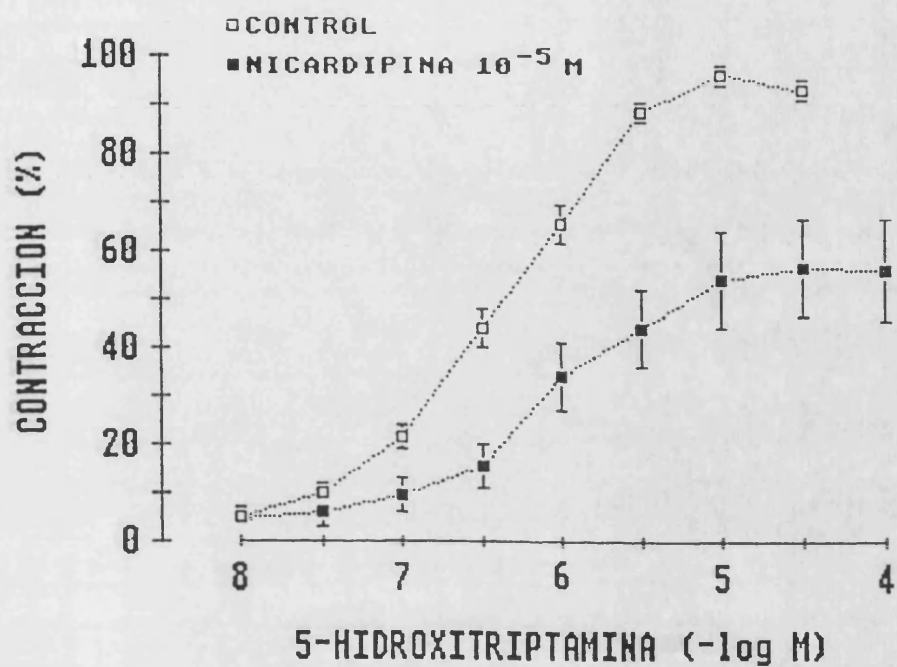


FIGURA 24.- Curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nicardipina. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

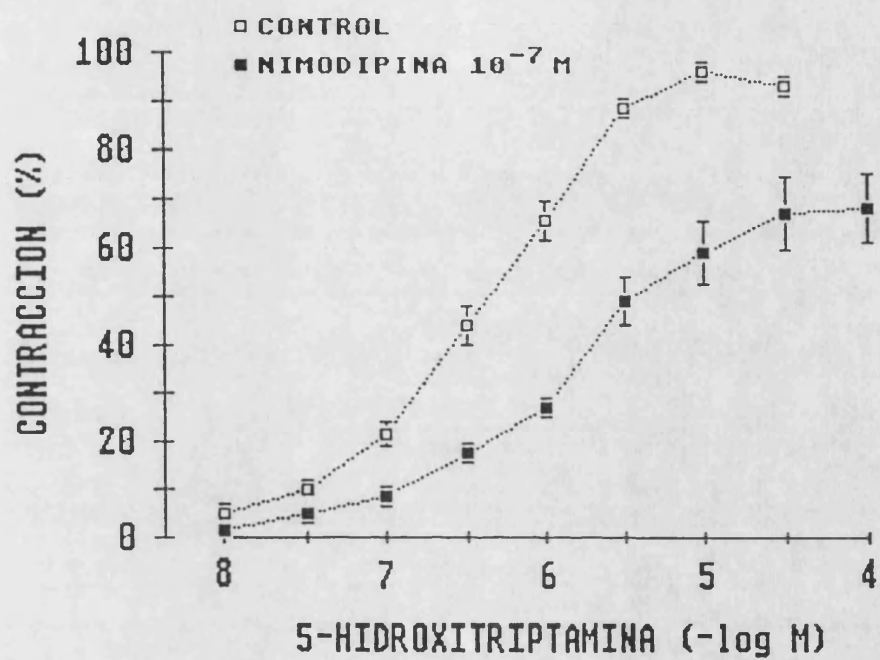


FIGURA 25.- Curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nimodipina. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

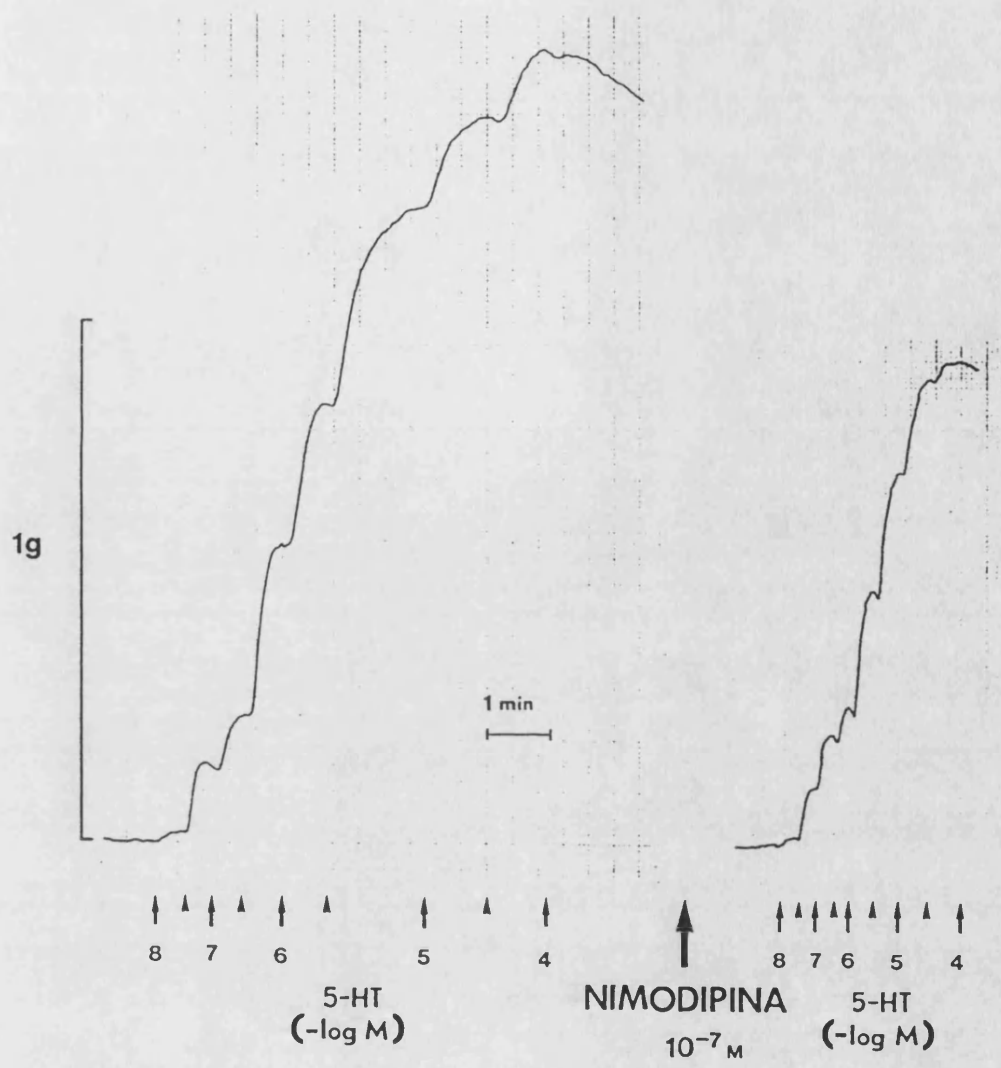


FIGURA 26.- Registro representativo de la contracción dosis-dependiente de la ACM con 5-hidroxitriptamina (5-HT), antes y durante la incubación con nimodipina.

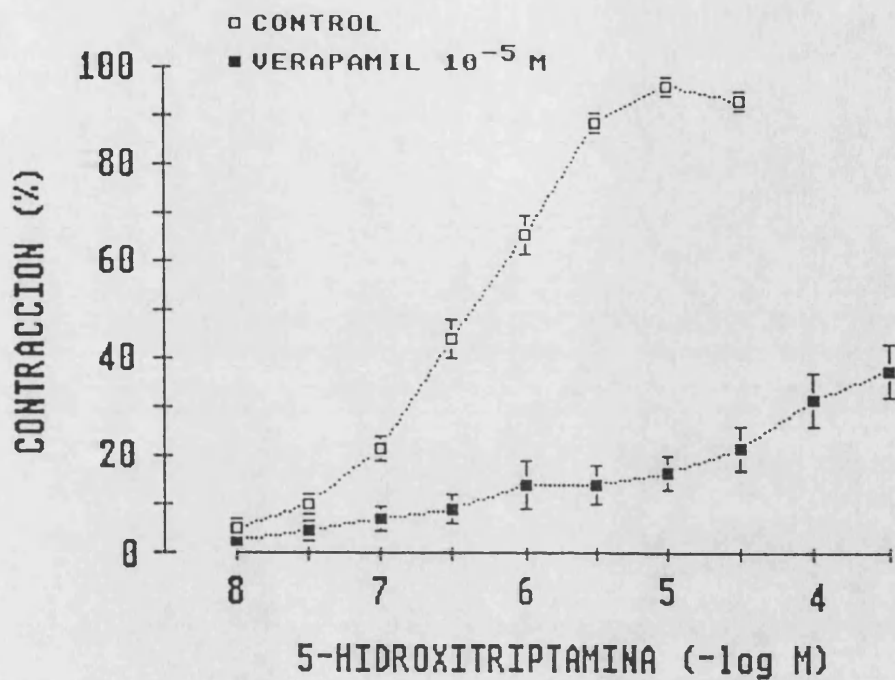


FIGURA 27.- Curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con verapamil. Los datos se expresan como porcentaje del Emáx control y representan la media±EEM de 8 determinaciones.

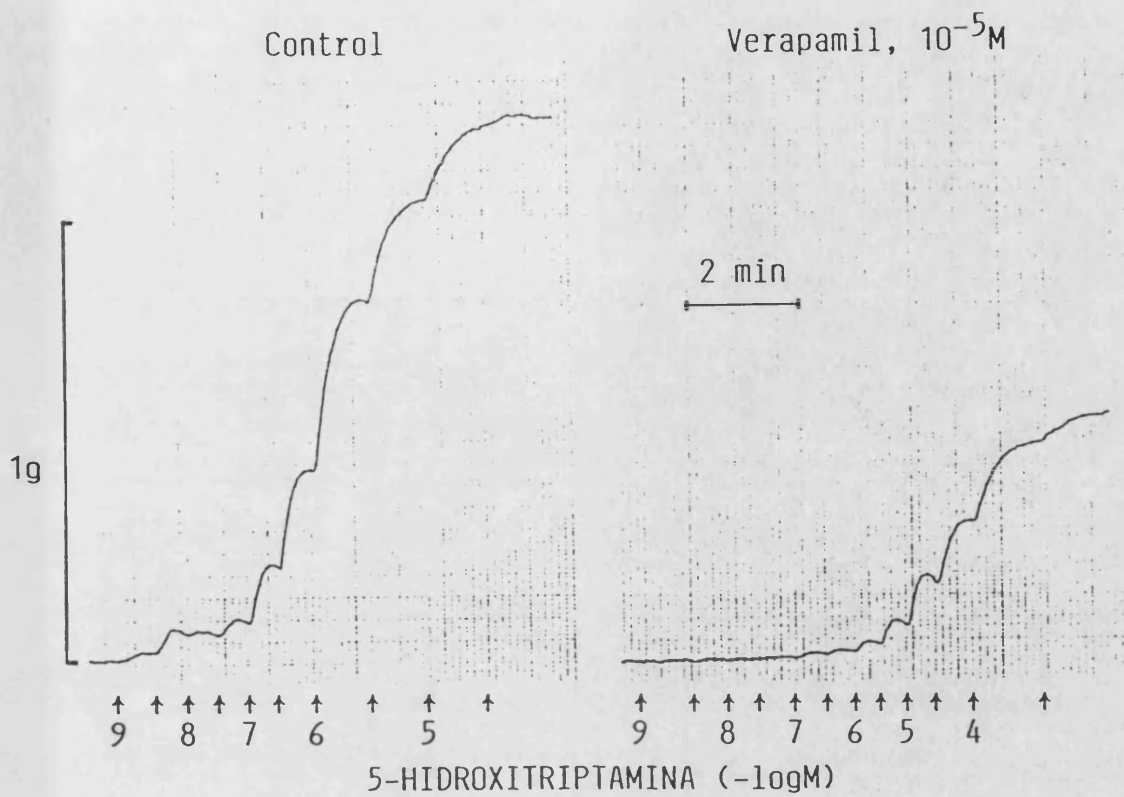


FIGURA 28.- Registro representativo de la contracción dosis-dependiente de la ACM con 5-hidroxitriptamina (5-HT), antes y durante la incubación con verapamil.

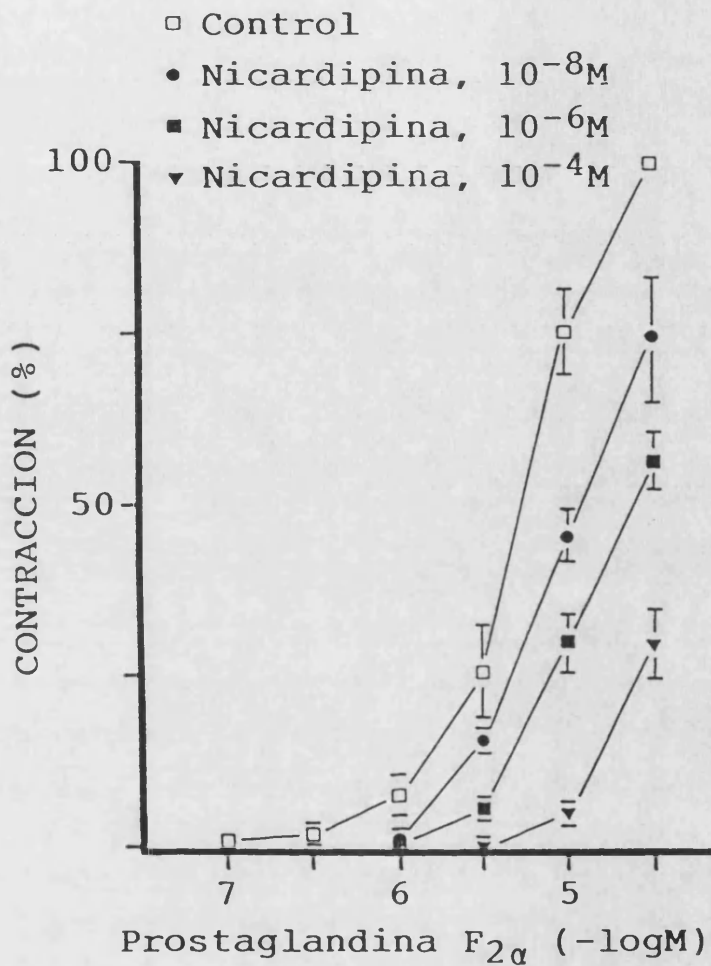


FIGURA 29.- Curva dosis-efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nicardipina. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 7 determinaciones.

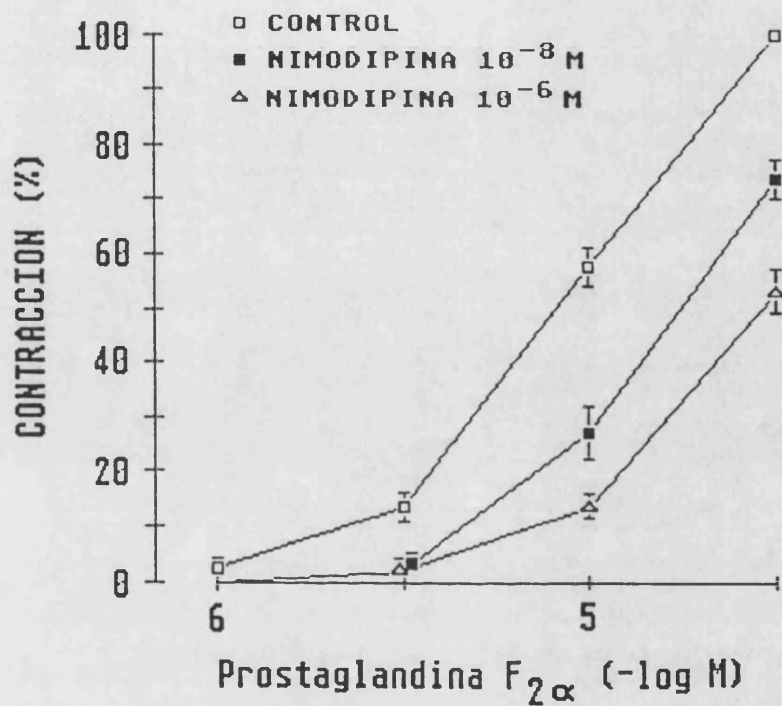


FIGURA 30.- Curva dosis-efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con nimodipina. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 7 determinaciones.

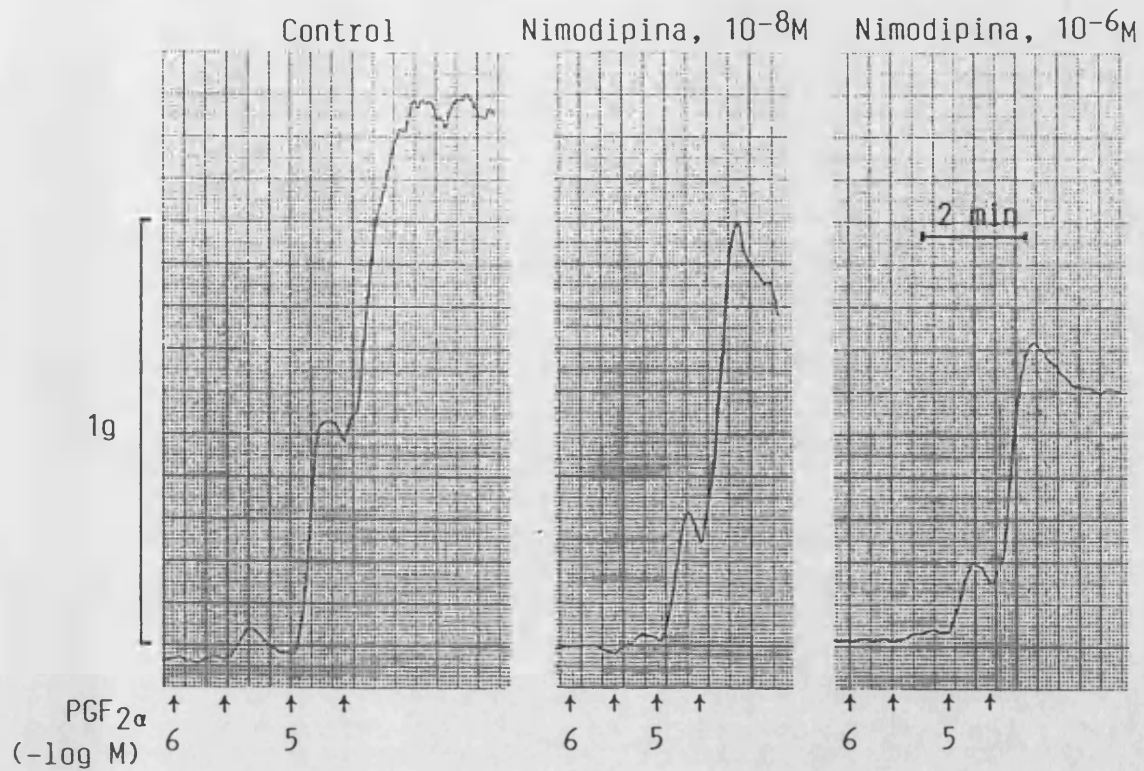


FIGURA 31.- Registro representativo de la contracción dosis-dependiente de la ACM con prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), antes y durante la incubación con nimodipina.

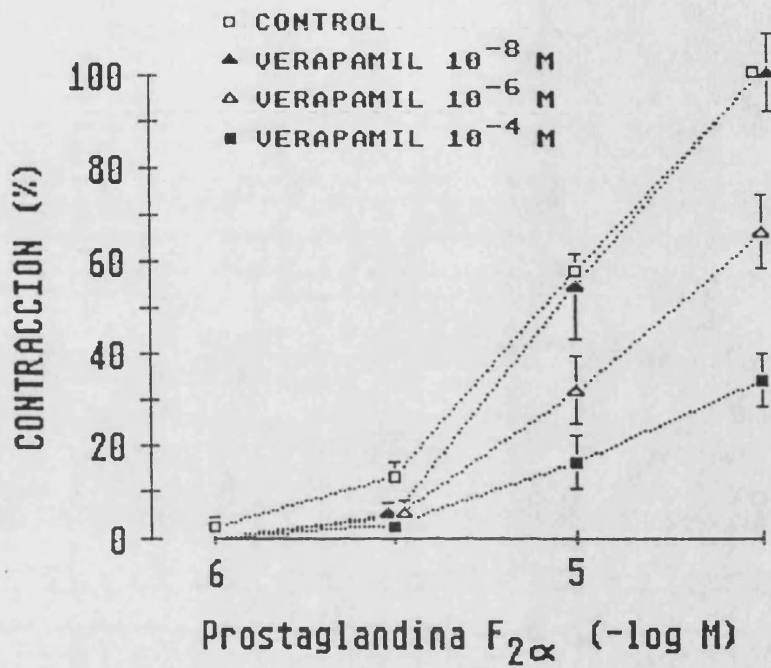


FIGURA 32.- Curva dosis-efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre la ACM en condiciones control y durante incubación con verapamil. Los datos se expresan como porcentaje del $E_{m\acute{a}x}$ control y representan la media \pm EEM de 7 determinaciones.

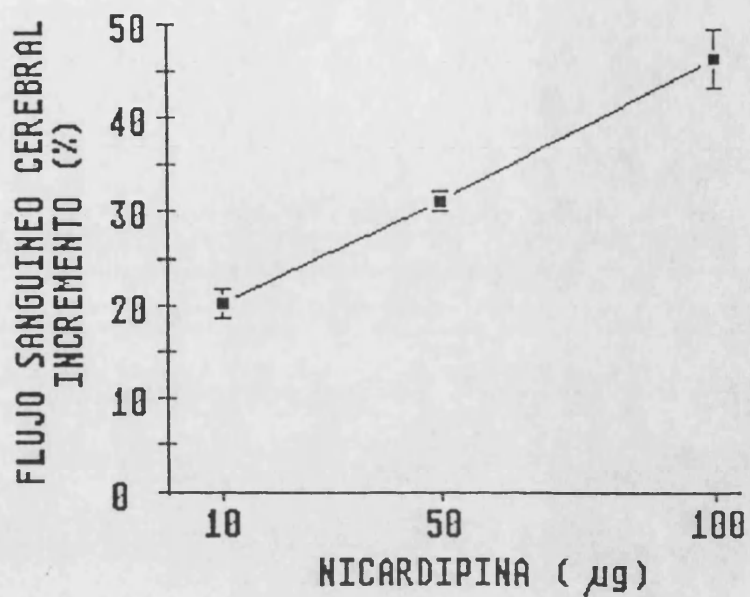


FIGURA 33.- Curva dosis-efecto de la nicardipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como incremento porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 12 animales.

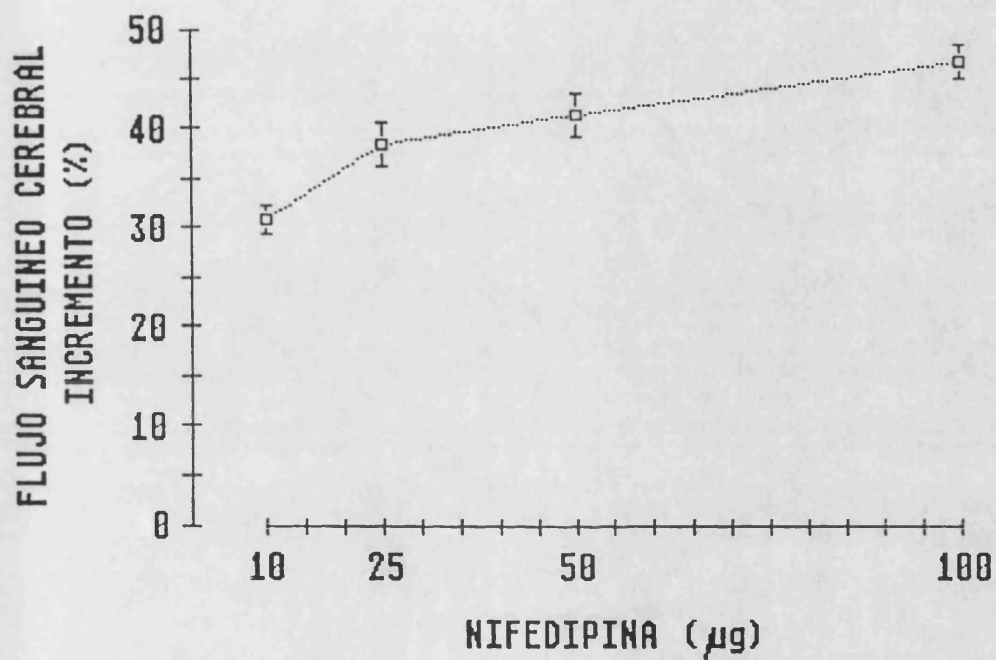


FIGURA 34.- Curva dosis-efecto de la nifedipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como incremento porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 10 animales.

NIFEDIPINA

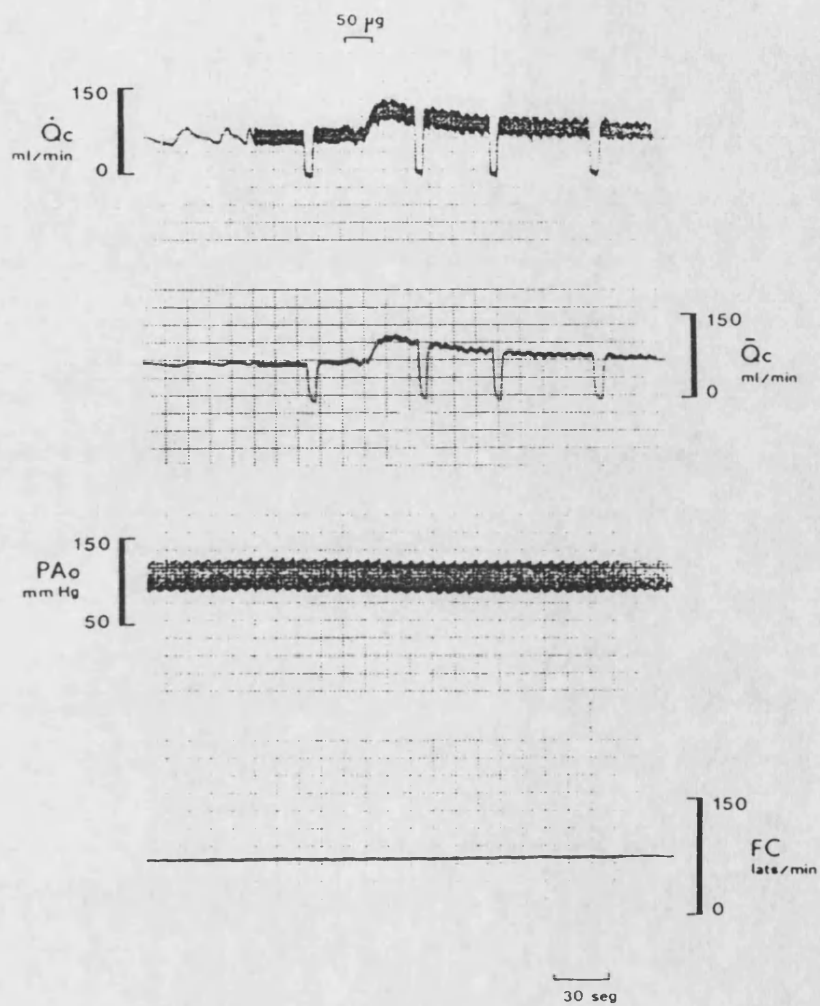


FIGURA 35.- Registro representativo del efecto de la nifedipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral pulsátil (\dot{Q}_c), flujo sanguíneo cerebral medio (\bar{Q}_c), presión arterial sistémica (PAo) y frecuencia cardíaca (FC).

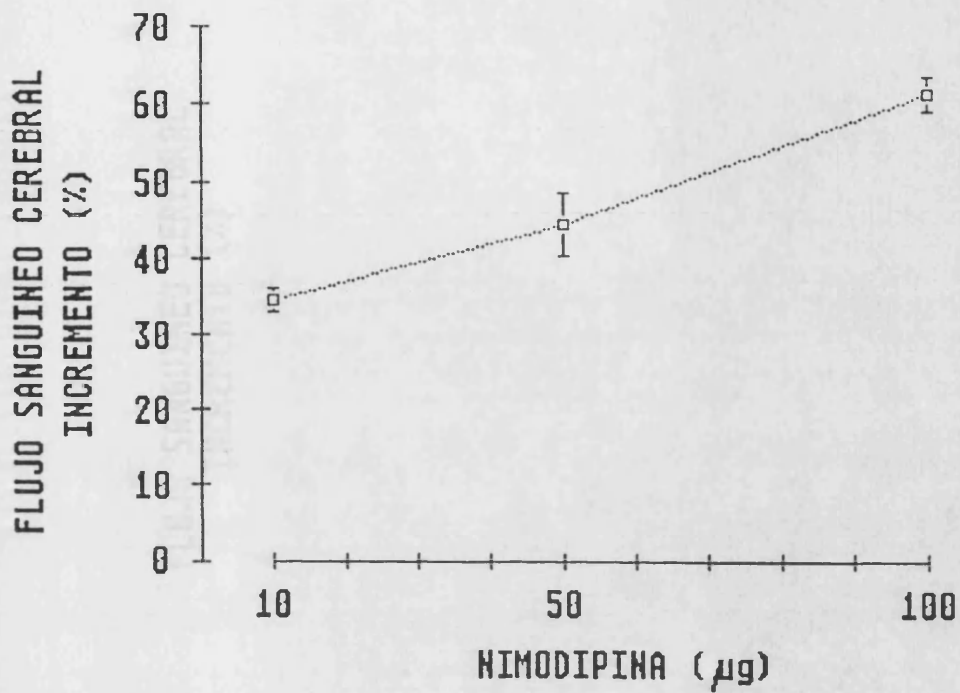


FIGURA 36.- Curva dosis-efecto de la nimodipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como incremento porcentual respecto al control y representan la media \pm EEM de los valores obtenidos en 10 animales.

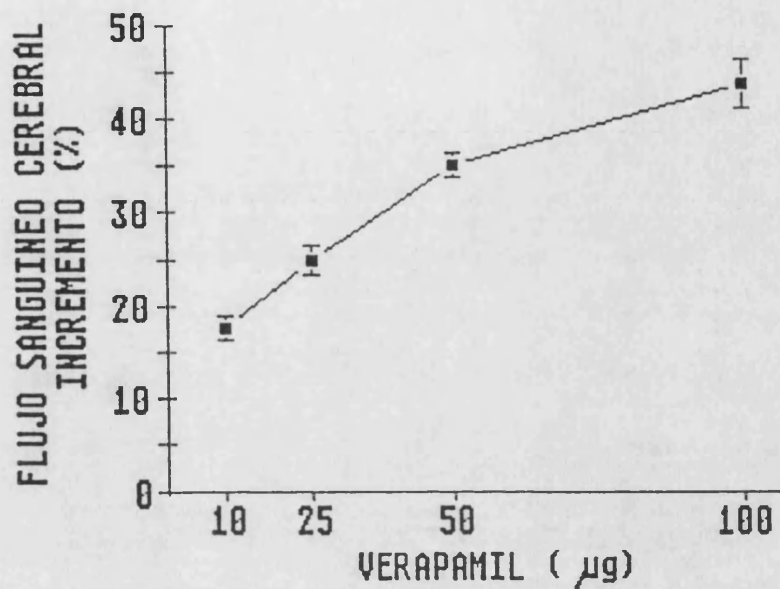


FIGURA 37.- Curva dosis-efecto del verapamil, inyectado en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como incremento porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales.

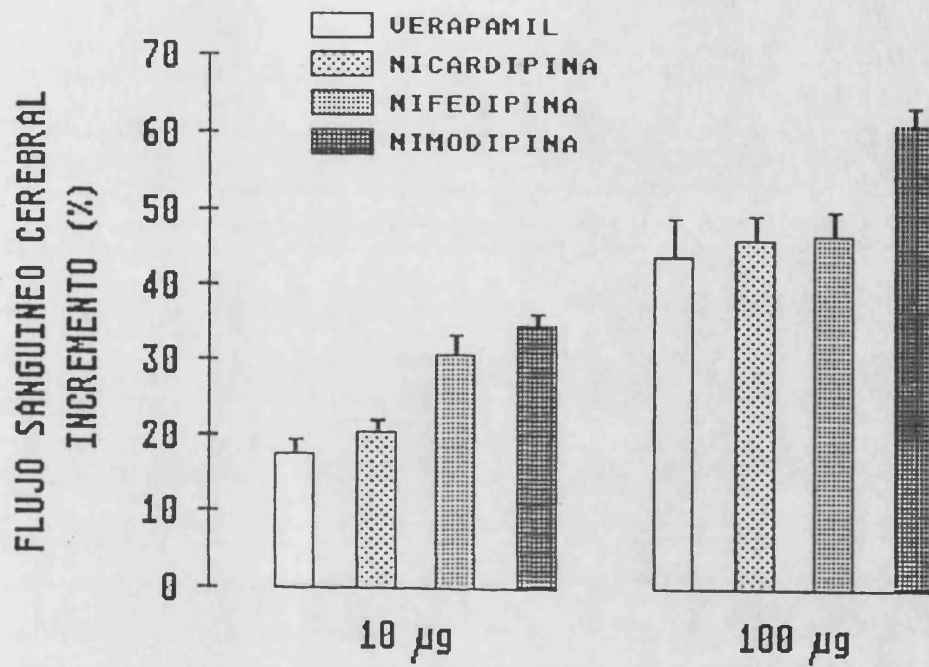


FIGURA 38.- Comparación de los efectos de la nicardipina, nifedipina, nimodipina y verapamil, inyectados en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como incremento porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 12, 10, 10 y 6 animales, respectivamente.

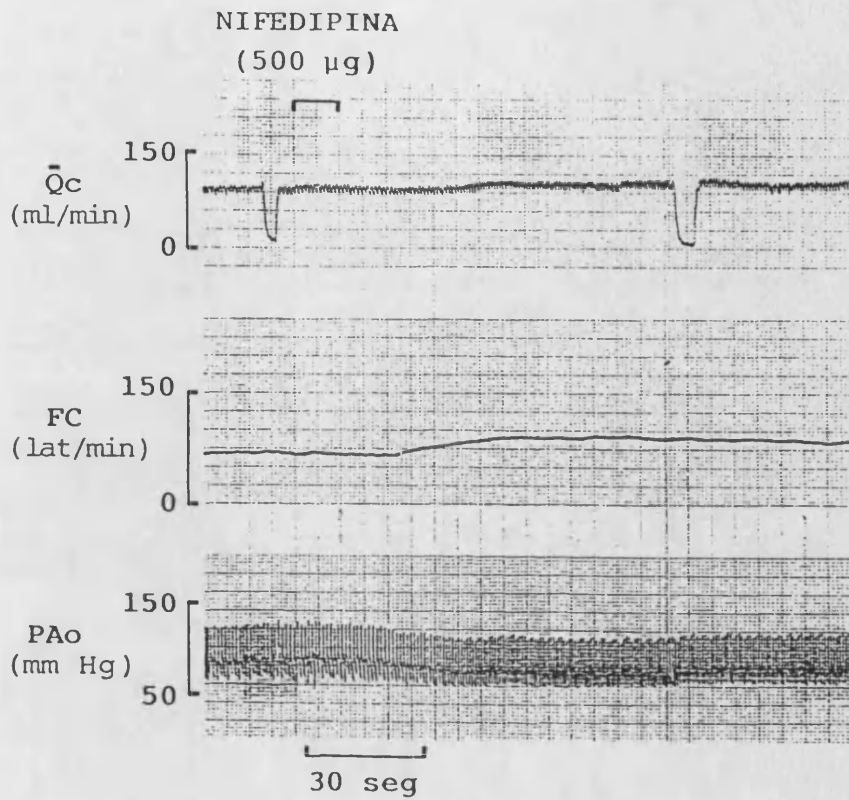


FIGURA 39.- Registro representativo del efecto de la nifedipina, inyectada por vía intravenosa, sobre el flujo sanguíneo cerebral medio (\bar{Q}_c), la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial sistémica (PAo).

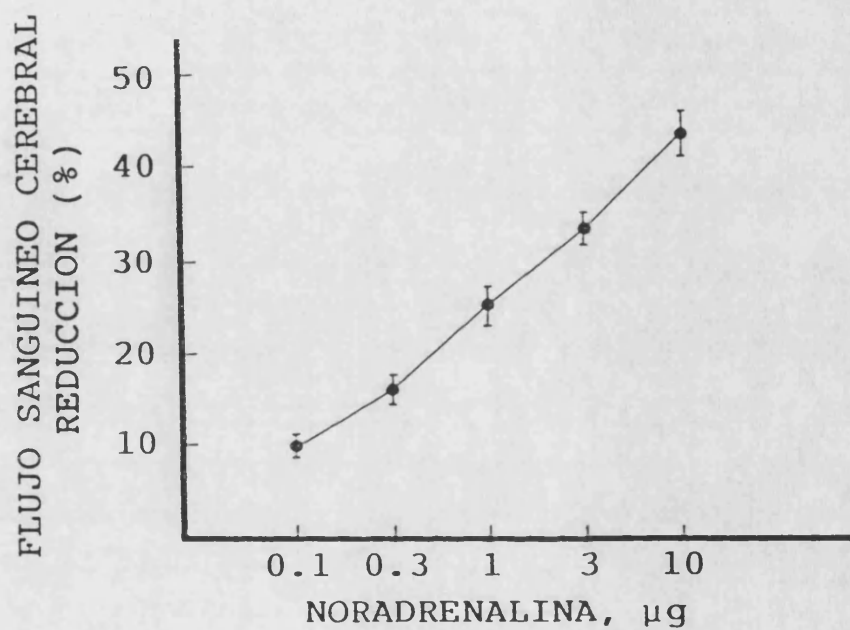


FIGURA 40.- Curva dosis-efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales.

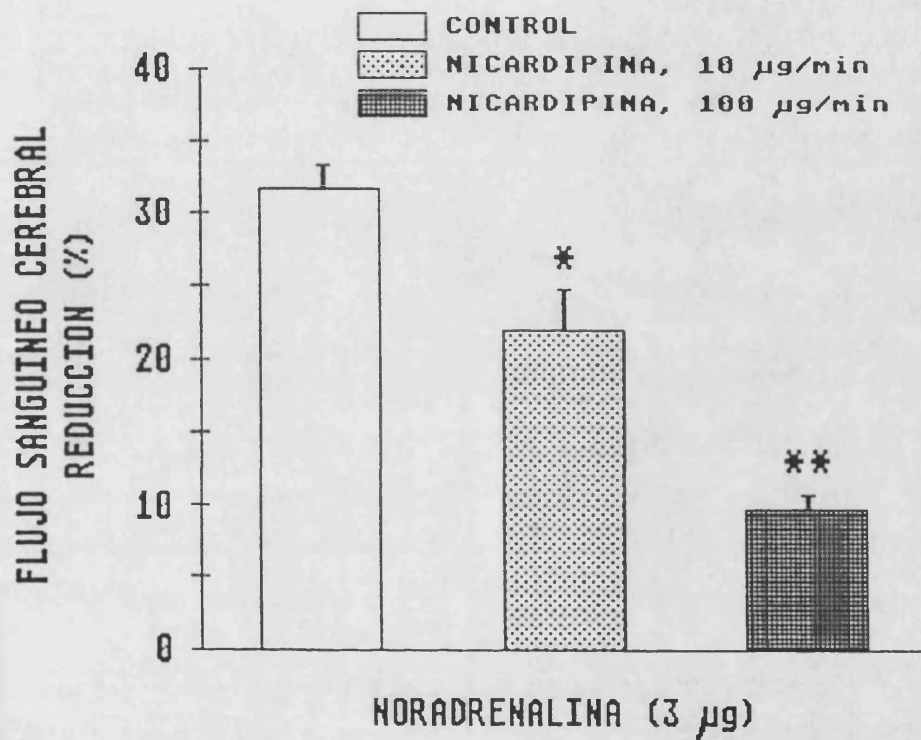


FIGURA 41.- Efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de nicardipina. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.05$.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

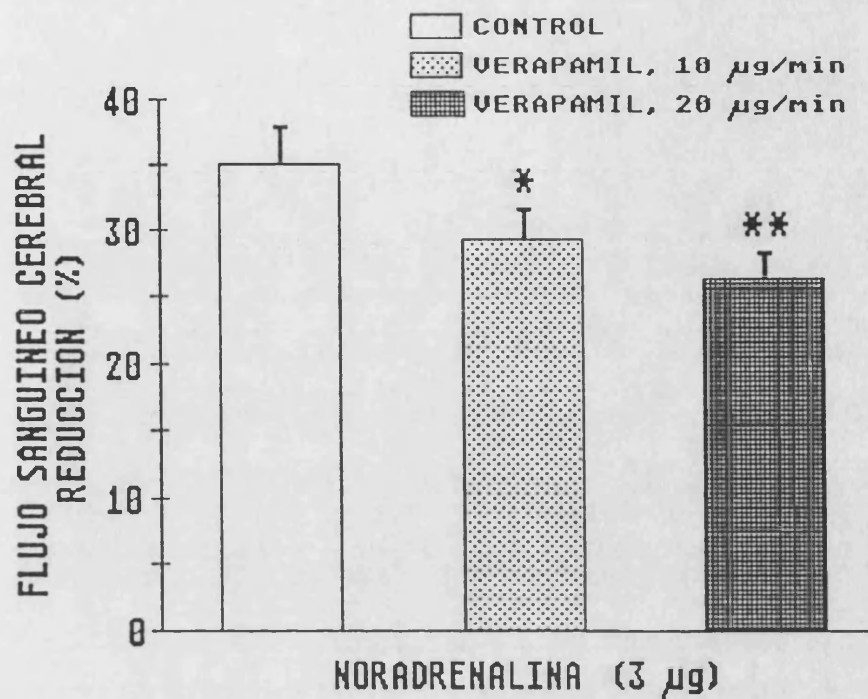


FIGURA 42.- Efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de verapamil. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.05$.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

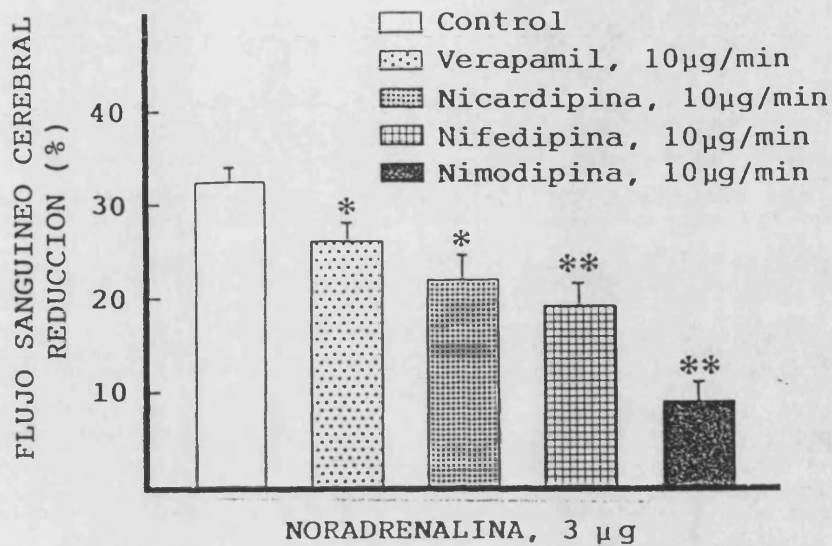


FIGURA 43.- Comparación del efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de nicardipina, nifedipina, nimodipina y verapamil. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.05$.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

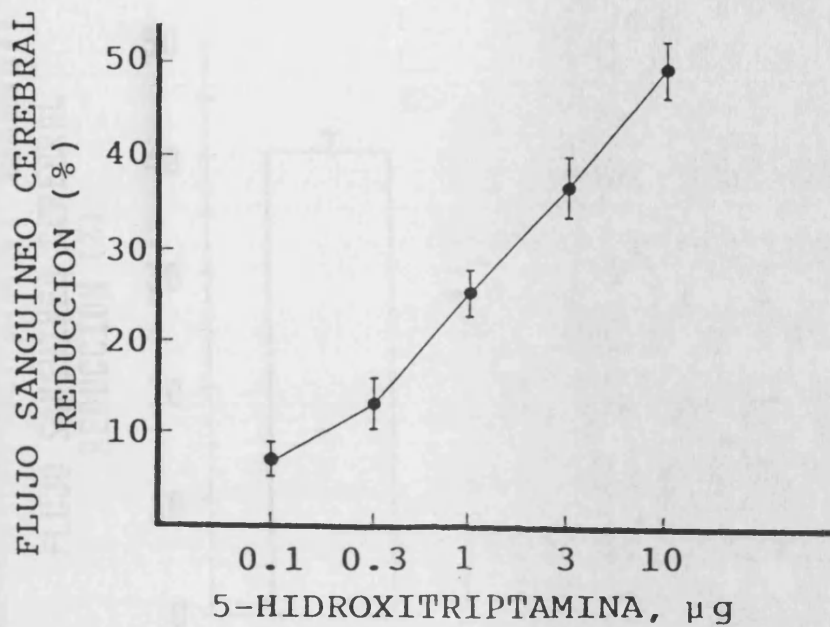


FIGURA 44.- Curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales.

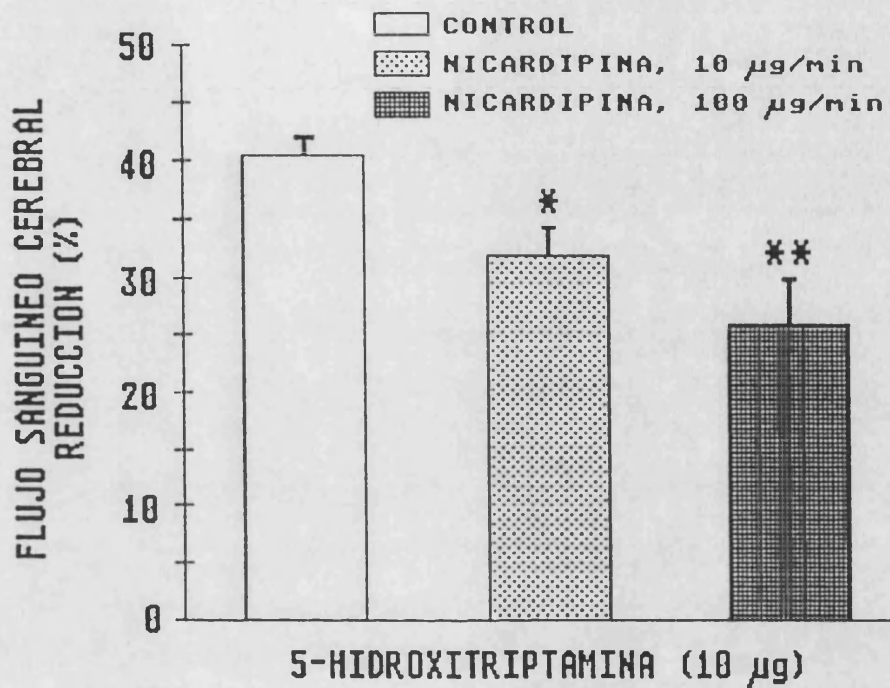


FIGURA 45.- Efecto de la 5-hidroxitriptamina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de nicardipina. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.05$.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

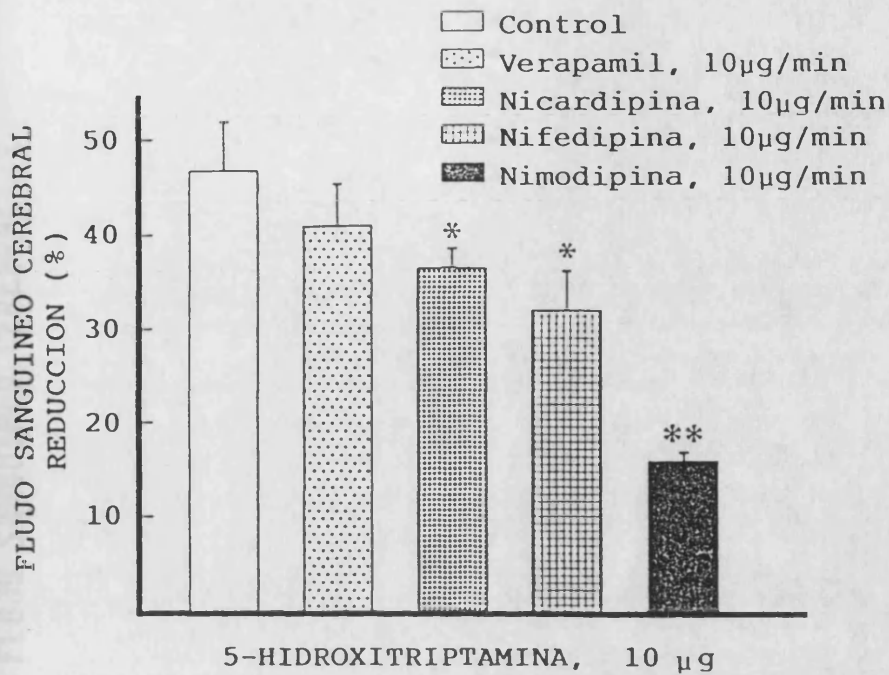


FIGURA 46.- Comparación del efecto de la 5-hidroxitriptamina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de nicardipina, nifedipina, nimodipina y verapamil. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.05$.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

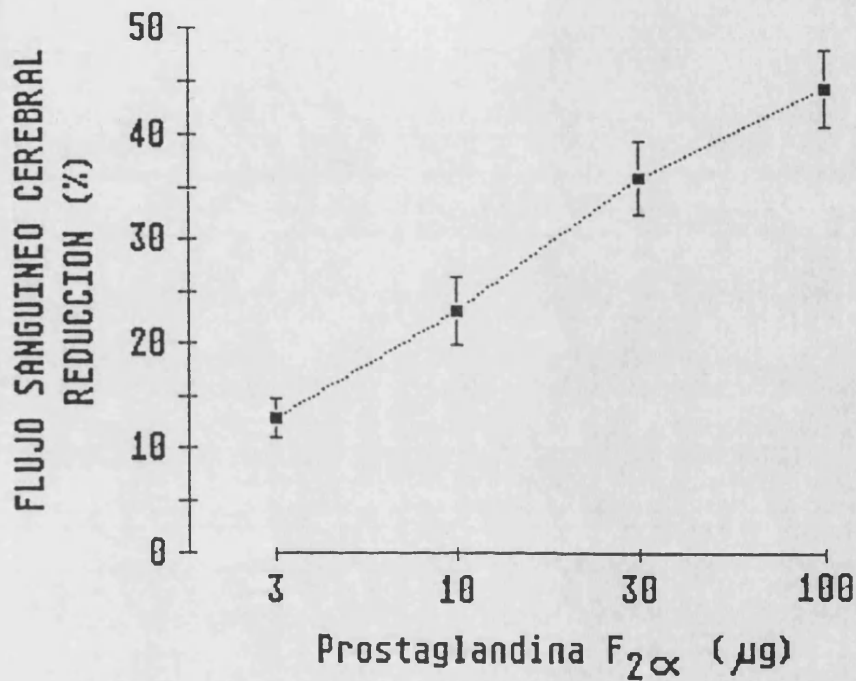


FIGURA 47.- Curva dosis-efecto de la prostaglandina F₂α, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 4 animales.

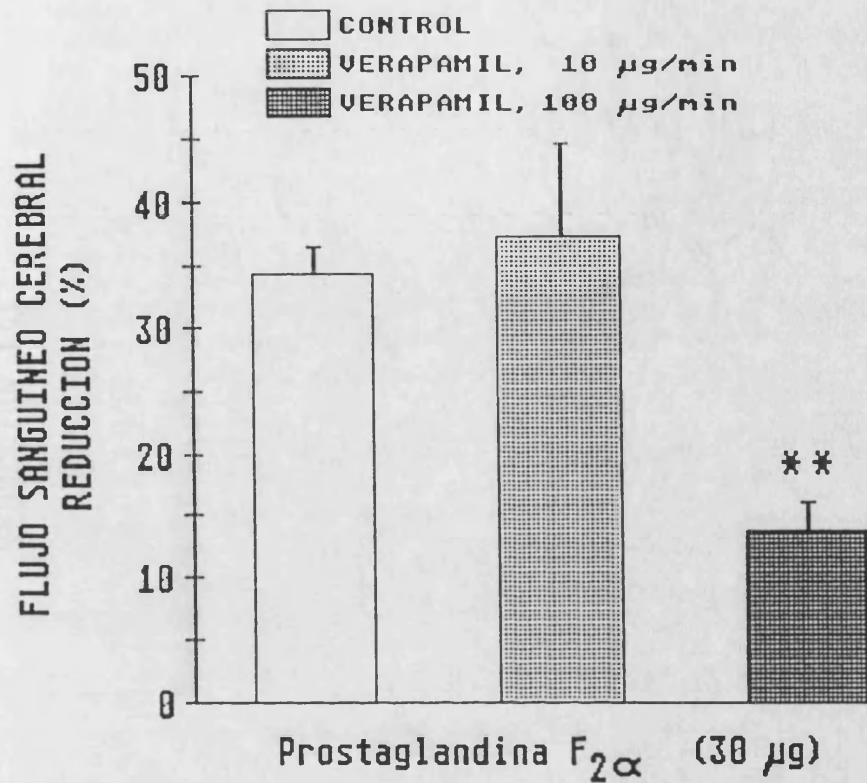


FIGURA 48.- Efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de verapamil. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media \pm EEM de los valores obtenidos en 4 animales.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

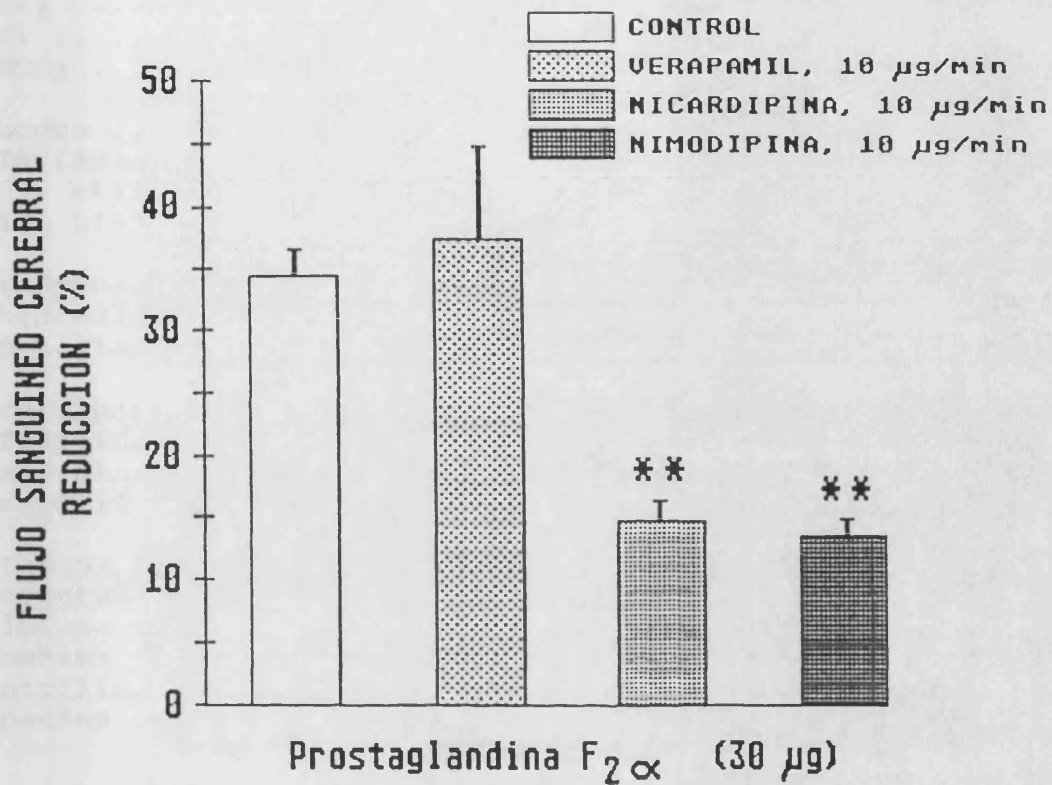


FIGURA 49.- Comparación del efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de nicardipina, nimodipina y verapamil. Los datos se expresan como reducción porcentual respecto al control y representan la media±EEM de los valores obtenidos en 4 animales.

** Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

TABLA 1.- Compuestos y fármacos utilizados en ambos modelos experimentales, con su procedencia.

CaCl ₂	Merck
KCl	"
MgCl ₂	"
NaCl	"
NaHCO ₃	"
Glucosa	"
EGTA (Acido etilenglicol-bis-(B-amino- etil-eter)N,N tetraacético)	Sigma
Acido L(+) ascórbico	Merck
Noradrenalina (L-arterenol)	Sigma
5-hidroxitriptamina	"
Prostaglandina F _{2α}	"
Nicardipina	Ferrer Internacional
Nifedipina	Bayer AG
Nimodipina	"
Verapamil (Manidon)	Knoll
Ketamina HCl (Ketolar)	Parke-Davis
Tiopental sódico (Pentothal sódico)	Abbott
Halotano (Fluothane)	ICI Farma
Trombina (Topostasine)	Roche
Penicilina G benzatina (Benzetacil 600) ...	Antibióticos S.A.
Heparina sódica (Heparina Rovi)	Rovi

TABLA 2.- Valores de la ED₅₀ y el Emáx de las curvas dosis-efecto del KCl, la noradrenalina (NA), la 5-hidroxitriptamina (5-HT) y la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) sobre la ACM de cabra, en medio normal (control), en medio sin Ca²⁺ (Ca(0)) y en medio sin Ca²⁺ al que se adicionó EGTA 1mM (Ca(0)+EGTA). Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=8.

		CONTROL	Ca(0)	Ca(0)+EGTA
KCl	Emáx	100%	31.2±5.4% **	22.2±2.2% **
	ED ₅₀	49.8 (45.4-54.6)mM	106.9 ** (96.0-119.0)mM	118.8 ** (97.5-144.8)mM
NA	Emáx	100%	12.5±2.4% **	1.5±0.4% **
	ED ₅₀	2.3(1.6-3.3) x10 ⁻⁶ M	1.4(0.8-2.5) x10 ⁻⁶ M	1.3(0.6-2.6) x10 ⁻⁶ M
5-HT	Emáx	100%	64.2±4.0% **	25.0±7.6% ** (a)
	ED ₅₀	4.1(3.1-5.5) x10 ⁻⁷ M	6.7(3.7-12.2) x10 ⁻⁷ M	1.9(0.8-4.3) ** x10 ⁻⁶ M
PGF _{2α}	Emáx	100%	36.9±1.8% **	17.6±3.7% ** (a)
	ED ₅₀	8.9(7.7-10.1) x10 ⁻⁶ M	1.0(0.9-1.2) x10 ⁻⁵ M	1.0(0.8-1.3) x10 ⁻⁵ M

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

(a) Significativamente diferente de Ca(0), p<0.01.

TABLA 3.- Valores de ED₅₀ y Emáx de las curvas dosis-efecto de la nicardipina, la nimodipina y el verapamil sobre la ACM precontraída con KCl o prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=9.

		NICARDIPINA	NIMODIPINA	VERAPAMIL
KCl (100mM)	Emáx	97.7±0.6%	88.8±2.8%	95.5±2.2%
	ED ₅₀	3.8(3.2-4.5) x10 ⁻⁹ M	3.9(3.2-4.6) x10 ⁻¹⁰ M	6.0(1.9-19.0) x10 ⁻⁸ M
PGF _{2α} (10 ⁻⁵ M)	Emáx	91.4±9.8%	73.1±2.0%	50.5±4.5%
	ED ₅₀	6.8(3.0-15.0) x10 ⁻⁶ M	4.3(2.4-7.6) x10 ⁻⁸ M	3.9(2.5-6.0) x10 ⁻⁶ M

TABLA 4.- Valores de ED₅₀ y Emáx de la curva dosis-efecto del CaCl₂ sobre la ACM previamente despolarizada con KCl en medio sin Ca²⁺, en condiciones control y durante la incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina y verapamil. Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=6.

	CaCl ₂ (K ⁺ 100mM)	
	ED ₅₀	Emáx
CONTROL	7.4(5.6-9.8) x10 ⁻⁴ M	100% (2154±197mg)
NICARDIPINA 10 ⁻⁸ M	1.9(1.2-2.9) * x10 ⁻³ M	14.3±2.2% **
NICARDIPINA 10 ⁻⁶ M	1.9(0.5-8.1) * x10 ⁻³ M	3.5±0.9% **
NIMODIPINA 10 ⁻¹⁰ M	2.2(2.0-2.5) * x10 ⁻³ M	50.6±11.9% **
NIMODIPINA 10 ⁻⁸ M	3.0(2.5-3.5) ** x10 ⁻³ M	14.7±1.6% ** (a)
VERAPAMIL 10 ⁻⁶ M	2.6(1.7-4.1) * x10 ⁻³ M	36.8±11.1% **

* Significativamente diferente del control, p<0.05.

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

(a) Significativamente diferente de nimodipina 10⁻¹⁰M, p<0.01.

TABLA 5.- Valores de ED₅₀ y Emáx de la curva dosis-efecto del KCl sobre la ACM, en condiciones control y durante la incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina y verapamil. Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=10.

	ED ₅₀	KCl	Emáx
CONTROL	49.8 (45.4-54.6)mM		100% (1614±132mg)
NICARDIPINA 10 ⁻¹⁰ M	51.7 (37.3-71.6)mM		59.3±2.2% **
NICARDIPINA 10 ⁻⁸ M	107.3 ** (98.6-116.9)mM		37.6±3.3% ** (a)
NIMODIPINA 10 ⁻¹⁰ M	53.1 (27.9-101.2)mM		62.7±6.6% **
NIMODIPINA 10 ⁻⁸ M	87.4 ** (63.3-120.6)mM		30.5±0.9% ** (b)
VERAPAMIL 10 ⁻¹⁰ M	68.0 (51.0-90.6)mM		91.3±4.0% *
VERAPAMIL 10 ⁻⁸ M	75.3 * (53.4-106.1)mM		80.7±5.3% **
VERAPAMIL 10 ⁻⁶ M	112.7 ** (104.2-121.8)mM		36.7±2.9% ** (c)

* Significativamente diferente del control, p<0.05.

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

(a) Significativamente diferente de nicardipina 10⁻¹⁰M, p<0.01.

(b) Significativamente diferente de nimodipina 10⁻¹⁰M, p<0.01.

(c) Significativamente diferente de verapamil 10⁻⁸M, p<0.01.

TABLA 6.- Valores de ED₅₀ y Emáx de la curva dosis-efecto de la noradrenalina sobre la ACM, en condiciones control y durante la incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina y verapamil. Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=8.

NORADRENALINA

	ED ₅₀	Emáx
CONTROL	2.3(1.6-3.3) x10 ⁻⁶ M	100% (1740±221mg)
NICARDIPINA 10 ⁻⁷ M	8.8(6.3-12.4) * x10 ⁻⁷ M	38.3±7.9% **
NIMODIPINA 10 ⁻⁷ M	8.6(3.3-22.2) * x10 ⁻⁷ M	28.3±4.5% **
VERAPAMIL 10 ⁻⁶ M	3.5(2.7-4.7) x10 ⁻⁶ M	34.5±5.0% **

* Significativamente diferente del control, p<0.05.

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

TABLA 7.- Valores de ED₅₀ y Emáx de la curva dosis-efecto de la 5-hidroxitriptamina sobre la ACM, en condiciones control y durante la incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina y verapamil. Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=8.

5-HIDROXITRIPTAMINA

	ED ₅₀	Emáx
CONTROL	4.1(3.1-5.5) x10 ⁻⁷ M	100% (1821±143mg)
NICARDIPINA 10 ⁻⁵ M	7.9(5.5-11.2) x10 ⁻⁷ M	56.4±10.2% **
NIMODIPINA 10 ⁻⁷ M	1.4(1.1-1.8) x10 ⁻⁶ M	68.1±7.1% **
VERAPAMIL 10 ⁻⁵ M	1.0(0.1-8.2) ** x10 ⁻⁵ M	37.1±5.5% **

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

TABLA 8.- Valores de ED₅₀ y Emáx de la curva dosis-efecto de la prostaglandina F_{2α} sobre la ACM, en condiciones control y durante la incubación de los segmentos arteriales con nicardipina, nimodipina y verapamil. Los valores de Emáx se expresan como la media±EEM. Los valores de ED₅₀ se expresan como la media con sus límites de confianza del 95%. n=7.

PROSTAGLANDINA F _{2α}		
	ED ₅₀	Emáx
CONTROL	8.9(7.7-10.1) x10 ⁻⁶ M	100% (2210±131mg)
NICARDIPINA 10 ⁻⁸ M	6.8(4.9-9.4) * x10 ⁻⁶ M	74.2±9.3% **
NICARDIPINA 10 ⁻⁶ M	1.0(0.8-1.3) x10 ⁻⁵ M	56.8±4.1% ** (a)
NICARDIPINA 10 ⁻⁴ M	1.5(1.3-1.8) x10 ⁻⁵ M	29.9±5.2% ** (b)
NIMODIPINA 10 ⁻⁸ M	1.2(1.0-1.6) x10 ⁻⁵ M	73.6±3.6% **
NIMODIPINA 10 ⁻⁶ M	1.4(1.3-1.5) * x10 ⁻⁵ M	52.9±4.3% ** (c)
VERAPAMIL 10 ⁻⁸ M	9.3(6.5-13.3) x10 ⁻⁶ M	100.8±8.0%
VERAPAMIL 10 ⁻⁶ M	1.0(0.7-1.4) x10 ⁻⁵ M	65.9±7.5% ** (d)
VERAPAMIL 10 ⁻⁴ M	1.1(0.7-1.6) x10 ⁻⁵ M	34.2±5.6% ** (e)

* Significativamente diferente del control, p<0.05.

** Significativamente diferente del control, p<0.01.

(a) Significativamente diferente de nicardipina 10⁻⁸M, p<0.05.

(b) Significativamente diferente de nicardipina 10⁻⁶M, p<0.01.

(c) Significativamente diferente de nimodipina 10⁻⁸M, p<0.01.

(d) Significativamente diferente de verapamil 10⁻⁸M, p<0.01.

(e) Significativamente diferente de verapamil 10⁻⁶M, p<0.01.

TABLA 9.- Efecto de la nicardipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 12 animales (* p<0.05).

	Control	Nicardipina (100 µg)	Incremento (%)
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	103.9±3.9	151.1±5.2	46.1±3.2 *
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	97.6±8.9	96.1±9.8	-1.4±0.8
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	65.6±2.5	67.2±2.3	2.7±1.0
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL ($\frac{\text{mm Hg}}{\text{ml/min por 100 g}}$)	1.0±0.2	0.7±0.1	-31.9±1.8 *

TABLA 10.- Efecto de la nifedipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 10 animales (* p<0.05).

	Control	Nifedipina (100 µg)	Incremento (%)
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	109.5±2.2	160.6±4.2	46.6±2.3 *
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	103.3±2.9	101.2±2.1	-2.1±0.9
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	76.3±1.2	78.4±3.1	2.7±1.3
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL ($\frac{\text{mm Hg}}{\text{ml/min por 100 g}}$)	0.94±0.02	0.63±0.03	-32.9±2.8 *

TABLA 11.- Efecto de la nimodipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media \pm EEM de los valores obtenidos en 10 animales (* $p < 0.05$).

	Control	Nimodipina (100 μ g)	Incremento (%)
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	112.3 \pm 3.5	183.2 \pm 5.1	63.3 \pm 3.6 *
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	105.2 \pm 4.2	100.3 \pm 2.8	-4.7 \pm 2.8
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	77.4 \pm 3.6	79.3 \pm 2.2	2.6 \pm 1.2
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL ($\frac{\text{mm Hg}}{\text{ml/min por 100 g}}$)	0.93 \pm 0.05	0.54 \pm 0.02	41.9 \pm 1.7 *

TABLA 12.- Efecto de la nimodipina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre los valores de pH, pCO₂ y pO₂ arteriales de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 5 animales.

	CONTROL	NIMODIPINA (100 µg)
pH	7.43±0.01	7.44±0.02
pCO ₂	36.7±0.9	36.9±1.8
pO ₂	84.2±2.6	83.7±2.3

BIBLIOTECA
FACULTAT DE C. BIOLÒGQUES
VALÈNCIA

TABLA 13.- Efecto del verapamil, inyectado en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales (* p<0.05).

	Control	Verapamil (100 µg)	Incremento (%)
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	100.8±2.9	145.1±4.3	43.7±4.9 *
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	98.2±6.9	97.3±5.7	-1.3±0.7
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	64.6±3.2	66.1±3.2	2.5±0.9
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL ($\frac{\text{mm Hg}}{\text{ml/min por 100 g}}$)	1.0±0.2	0.7±0.1	-29.8±1.9 *

TABLA 14.- Efecto de la nifedipina, inyectada por vía intravenosa, sobre el flujo sanguíneo cerebral, la presión arterial y la resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 5 animales (* p<0.05).

	Control	Nifedipina (500 µg) i.v.	Incremento (%)
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	110.2±4.5	123.4±3.6	11.9±3.3 *
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	98.5±2.3	90.6±3.1	-8.0±1.8 *
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL ($\frac{\text{mm Hg}}{\text{ml/min por 100 g}}$)	0.89±0.04	0.73±0.02	-17.9±1.9 *

TABLA 15.- Efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de nicardipina. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales (* p<0.05; ** p<0.01).

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL
(ml/min por 100 g)

	Control	Noradrenalina (3 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	102.8±4.7	70.2±3.6	31.8±1.6
Durante Nicardipina (10 µg/min)	139.7±11.8	109.2±11.3	21.9±2.9 *
Durante Nicardipina (100 µg/min)	152.5±16.1	137.7±14.6	9.8±1.0 **

TABLA 16.- Efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de nifedipina y nimodipina. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales (** p<0.01).

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL
(ml/min por 100 g)

	Control	Noradrenalina (3 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	105.9±4.6	68.8±3.7	35.0±3.1
Durante Nifedipina (10 µg/min)	137.4±4.1	110.7±2.7	19.4±2.6 **
Durante Nimodipina (10 µg/min)	150.3±6.2	135.5±4.8	9.8±2.4 **

TABLA 17.- Efecto de la noradrenalina, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de verapamil. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 7 animales (* p<0.05; ** p<0.01).

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)			
	Control	Noradrenalina (3 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	101.7±4.2	65.4±4.4	35.0±3.1
Durante Verapamil (10 µg/min)	110.3±7.5	77.9±5.0	29.3±2.4 *
Durante Verapamil (20 µg/min)	118.6±9.1	86.2±6.9	26.4±2.1 **

TABLA 18.- Efecto de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de nicardipina. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales (* p<0.05; ** p<0.01).

	FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)		
	Control	5-HT (10 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	106.3±7.4	63.2±6.0	40.6±1.7
Durante Nicardipina (10 µg/min)	144.5±10.2	98.6±5.7	31.8±2.4 *
Durante Nicardipina (100 µg/min)	157.7±8.2	116.8±10.1	6.0±5.9 **

TABLA 19.- Efecto de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestésiar, antes y durante la infusión de nifedipina y nimodipina. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 6 animales (* p<0.05; ** p<0.01).

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL
(ml/min por 100 g)

	Control	5-HT (10 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	110.6±5.4	58.6±3.6	46.9±5.9
Durante Nifedipina (10 µg/min)	143.5±6.2	97.5±2.9	32.1±4.2 *
Durante Nimodipina (10 µg/min)	156.9±5.6	131.8±6.3	6.0±1.9 **

TABLA 20.- Efecto de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de verapamil. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 8 animales (** p<0.01).

	FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)		
	Control	5-HT (10 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	103.2±8.2	55.9±6.0	46.8±3.3
Durante Verapamil (10 µg/min)	111.9±9.1	65.5±5.7	41.0±2.0
Durante Verapamil (20 µg/min)	120.7±8.2	74.5±6.1	37.5±4.9 **

TABLA 21.- Efecto de la prostaglandina F_{2α}, inyectada en la arteria maxilar interna, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión de nicardipina, nimodipina y verapamil. Los datos expuestos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 4 animales (** p<0.01).

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL
(ml/min por 100 g)

	Control	Prostaglandina F _{2α} (30 µg)	Reducción (%)
Antes de la infusión	108.9±4.9	72.9±5.2	34.4±2.1
Durante Nicardipina (10 µg/min)	133.2±12.8	113.9±11.9	14.7±1.5 **
Durante Nimodipina (10 µg/min)	139.5±10.0	120.8±10.0	13.6±1.3 **
Durante Verapamil (10 µg/min)	95.4±21.4	62.9±19.2	37.4±7.3
Durante Verapamil (100 µg/min)	142.6±13.5	123.7±14.6	13.7±2.3 **

TABLA 22.- Efectos de diferentes fármacos BECa sobre la reducción del flujo sanguíneo cerebral inducida por la noradrenalina (NA), la serotonina (5-HT) y la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Los BECa se administraron en infusión de 10 μg/min. Los valores expuestos representan la media±EEM.

	INHIBICION DE LA VASOCONSTRICION (%)		
	NA (3 μg)	5-HT (10 μg)	PGF _{2α} (30 μg)
NICARDIPINA	30.79±8.78	24.20±3.89	54.03±3.84
NIFEDIPINA	43.64±4.50	31.18±4.80	-
NIMODIPINA	71.72±5.46	64.77±4.51	60.25±3.34
VERAPAMIL	16.43±1.50	12.38±2.03	-0.80±3.34

6.- DISCUSION

6.1.- *Consideraciones metodológicas.*

La diversidad de los métodos utilizados para evaluar la reactividad cerebrovascular es fuente de discrepancias en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación. Sin embargo, esa misma diversidad ofrece la posibilidad de complementar las ventajas de las distintas aproximaciones experimentales (53, 54).

Las primeras inquietudes por investigar la reactividad de los vasos cerebrales se resolvieron del modo más inmediato y sencillo posible: abriendo orificios en el cráneo para observar el calibre de los vasos piales (55). La incorporación de técnicas como la microinyección de fármacos y la captación de imágenes con videocámaras al método de las ventanas craneales ha proporcionado versiones mucho más sofisticadas ampliamente usadas en la actualidad (56).

El desarrollo de técnicas alternativas a la ventana craneal para estudiar la reactividad cerebrovascular ha seguido dos tendencias opuestas. De un lado, las técnicas "in vitro" pretenden, con el aislamiento de los vasos cerebrales en baños de órganos, simplificar la respuesta del tejido frente a un estímulo, evitando complejos mecanismos fisiológicos reguladores. Por otra parte, las técnicas "in vivo" poseen la ventaja de estudiar la reactividad cerebrovascular como un respuesta integrada en el conjunto del organismo (57).

Existen dos modos de preparar las arterias aisladas para la evaluación de respuestas mecánicas: la medición de fuerza y la perfusión (58). La medición y registro de fuerza (o tensión) desarrollada por el músculo liso vascular se puede llevar a cabo de varios modos, según se mida tensión isométrica, isotónica o auxotónica, empleando segmentos

arteriales cilíndricos o tiras helicoidales, etc. La obtención de tiras helicoidales resulta aconsejable en el caso de vasos de muy pequeño calibre, con el fin de aumentar la masa muscular a estudiar (57). Sin embargo, la integridad del endotelio vascular resulta comprometida.

Una alternativa para la medición de la reactividad en vasos de pequeño calibre consiste en canular un segmento vascular y perfundirlo a flujo o presión constante, evaluando los cambios en el parámetro que permanece variable. Usualmente se utilizan bombas de perfusión de flujo constante y se determinan cambios de presión en el sistema (57, 58).

Los primeros estudios de reactividad cerebrovascular "in vitro" se realizaron con un sistema de registro de tensión isométrica desarrollada por segmentos vasculares cilíndricos (44). Esta continúa siendo la técnica más utilizada para arterias cerebrales (53), aunque también se usa el registro de fuerza isométrica en tiras helicoidales (59, 60) y la canulación con perfusión a flujo constante (61, 62). En nuestros experimentos hemos registrado la tensión isométrica desarrollada por segmentos cilíndricos de la arteria cerebral media de cabra debido a que el calibre de dichas arterias era adecuado, y a la utilización por otros grupos de esta técnica en arterias cerebrales, lo cual facilita la comparación de los resultados. Por otra parte, la disposición de los cilindros arteriales pasando dos alambres finos a través de la luz vascular, de modo que se registra la tensión transversal, supone un deterioro endotelial mucho menor que la obtención de tiras helicoidales (63).

Las especies animales más frecuentemente utilizadas para estudiar la reactividad "in vitro" de las arterias cerebrales son el perro, el gato, el conejo, la rata y el mono. Además, se utilizan arterias cerebrales humanas procedentes de autopsias, lobectomías y otras intervenciones

neuroquirúrgicas. Aunque existen algunos estudios sobre receptores farmacológicos en las arterias cerebrales de cabra (64), no es ésta una especie animal de uso frecuente. Su utilización en nuestro trabajo se debe a que el otro modelo experimental utilizado en este estudio, la medición electromagnética del flujo sanguíneo cerebral, está desarrollado en la cabra por motivos que más adelante se detallarán. Dado que la reactividad vascular depende en algunos casos de la especie animal utilizada (53, 65) el uso de la misma especie en nuestros dos modelos experimentales resulta conveniente para la comparación de resultados.

Existen diferencias de reactividad entre las distintas arterias de la base del cerebro (53), e incluso a lo largo de una misma arteria (66, 67). Dichas diferencias se atribuyen a la heterogeneidad en la naturaleza y distribución de los receptores farmacológicos en las arterias (63). Nuestros estudios de reactividad "in vitro" se realizaron con segmentos de la arteria cerebral media. Las arterias comunmente utilizadas para este tipo de experimentos son las cerebrales medias y la basilar.

Las técnicas para estudiar "in vivo" la reactividad cerebrovascular son muy variadas, algunas tan simples pero cruentas como la medición del volumen de drenaje venoso, y otras tan complicadas pero incruentas como la medición del aclaramiento de trazadores inhalables, inertes y libremente difusibles (54, 55). Otras técnicas se basan en la localización y cuantificación "post mortem" de microesferas radiactivas y marcadores autorradiográficos inyectados en la circulación cerebral (54). Por último, existe un grupo de técnicas cuyo denominador común es el empleo de sondas (termopares, electrodos de O₂, fluxímetros electromagnéticos, etc.) (54).

Dos inconvenientes frecuentemente atribuidos a las técnicas de medición del flujo sanguíneo cerebral "in vivo"

son la necesidad, en muchos casos, de realizar los experimentos bajo anestesia, lo cual puede modificar la reactividad vascular, y la dificultad para asegurar que el flujo medido es sólo cerebral, y no cefálico (55). La cirugía requerida para excluir los aportes sanguíneos extracerebrales es a menudo extensa, produciendo situaciones hemodinámicas que se apartan bastante de la fisiológica (54, 68).

En nuestros experimentos hemos utilizado fluxímetros electromagnéticos para medir el flujo sanguíneo cerebral en la cabra despierta. Los dispositivos para fluximetría electromagnética se fundamentan en el principio de Faraday, según el cual cuando un conductor se mueve en un campo magnético produce una fuerza electromotriz. Básicamente son detectores de velocidad de fluidos y, de hecho, algunos de estos dispositivos se utilizan como velocímetros. Otros, como el utilizado en nuestros experimentos, son capaces de integrar los efectos de las fuerzas electromotrices generadas en distintos puntos del fluido, de modo que miden el flujo (volumen/tiempo) en un circuito. Estos últimos son los auténticos fluxímetros (52).

La técnica utilizada en nuestros experimentos permite evaluar la reactividad cerebrovascular en el animal despierto, evitando las interferencias de los anestésicos. Además, mediante un procedimiento quirúrgico relativamente sencillo se consigue aislar el aporte sanguíneo cerebral, eliminando el flujo sanguíneo extracerebral (49). La sencillez y eficacia del procedimiento quirúrgico se debe a la anatomía particular del lecho arterial cerebral en la cabra. En éste animal, la arteria maxilar interna, rama de la arteria carótida externa, suministra todo el flujo sanguíneo a un hemisferio cerebral, a través de la rete mirabile. Las arterias vertebrales no contribuyen al riego sanguíneo cerebral y, además, no existen arterias carótidas internas extracraneales. En consecuencia, con las operaciones de ligadura y trombosis realizadas durante la intervención quirúr-

gica para la preparación vascular se consigue que un fluxímetro electromagnético colocado alrededor de la arteria maxilar interna mida el flujo sanguíneo de un hemisferio cerebral, como ha sido confirmado inyectando microesferas radiactivas (^{51}Cr) y analizando su acumulación en tejidos cerebrales y extracerebrales. En condiciones normales el 75% del flujo sanguíneo de la arteria maxilar interna se dedica a territorios extracerebrales. Con la ligadura de la arteria maxilar interna el flujo extracerebral se reduce al 23%, y se atribuye a la circulación retrógrada desde la rete mirabile, a través de la arteria anastomótica. Este flujo retrógrado se elimina mediante trombosis, quedando reducido el flujo sanguíneo extracerebral a menos de un 3% del aporte de la arteria maxilar interna (68).

6.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales aisladas.

6.2.1.- Reactividad de las arterias cerebrales frente a la despolarización y los agonistas.

En nuestros experimentos, la arteria cerebral media (ACM) de cabra se contrajo de modo dosis-dependiente al estimularla con KCl, el cual provoca despolarización de la membrana de las células musculares lisas vasculares, así como con noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$). No hubo apenas diferencia en la eficacia de los estímulos utilizados. Tan sólo la actividad intrínseca de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue ligeramente superior a la del resto de los estímulos. En cambio, la potencia vasoconstrictora, reflejada en el valor de la ED_{50} (dosis efectiva media), sí que difirió notablemente. La menor potencia correspondió al KCl, de acuerdo con su mecanismo de acción despolarizante. Las sustancias que ejercen su acción de un modo simplemente físico o químico, sin la intervención de receptores farmacológicos específicos, necesitan alcanzar

concentraciones relativamente altas (57). Entre los agonistas, la 5-HT fue el más potente, pudiéndose establecer el siguiente orden: 5-HT NA $PGF_{2\alpha}$. Con la $PGF_{2\alpha}$ no se alcanzó un efecto máximo real. No se pudieron administrar dosis superiores a $3 \times 10^{-5}M$ debido a que el solvente (etanol) produjo vasorrelajación. El efecto alcanzado con la dosis superior utilizada se tomó como efecto máximo aparente, como ha sido descrito por otros autores para este prostanoides (69, 70).

La respuesta de la ACM de cabra observada en nuestros experimentos frente al KCl, la NA y la 5-HT confirma básicamente los resultados descritos en esta misma especie animal (64). La eficacia de la NA para producir contracción es el único punto discrepante. En la ACM de cabra se han descrito valores de eficacia de la NA dispares, en ocasiones mucho menores que la eficacia de la 5-HT (64) y en ocasiones cercanos a la eficacia de la 5-HT (71). En arterias piales humanas la eficacia de la NA alcanza valores incluso mayores que la 5-HT (72). Las arterias cerebrales de los primates, como el mono japonés y el hombre, son más reactivas frente a la NA, en comparación con otras especies como el perro y el gato (65).

La contracción de la ACM de cabra con NA está mediada por receptores α -adrenérgicos (64). Los receptores α -adrenérgicos no son iguales en las arterias cerebrales de todas las especies. Por ejemplo, en las arterias cerebrales de los primates la contracción con NA está mediada por receptores α_1 , mientras que en el perro y el gato, los receptores adrenérgicos cerebrovasculares son del tipo α_2 (73, 74). En la arteria basilar de conejo la curva dosis-efecto para la NA posee dos componentes, lo cual sugiere la intervención de dos poblaciones distintas de receptores adrenérgicos (75). Por lo tanto, las diferencias interespecíficas en la eficacia de la NA para contraer las arterias cerebrales puede explicarse por la presencia de subtipos diferentes de recep-

tores adrenérgicos. Este es un factor a considerar en los estudios sobre los movimientos de Ca^{2+} y los efectos de los fármacos BECa, pues los receptores $\alpha 1$ movilizan tanto Ca^{2+} extracelular como intracelular, mientras que los receptores $\alpha 2$ movilizan principalmente Ca^{2+} extracelular, al menos en las arterias cerebrales de rata (76).

La respuesta contráctil de la ACM de cabra frente a la 5-HT esta mediada por receptores triptaminérgicos (64). Si bien existe acuerdo en que la 5-HT es uno de los agentes vasoconstrictores más potentes en las arterias cerebrales (64, 77), la identidad de los receptores implicados es motivo de discrepancias. Las arterias cerebrales de conejo, gato, perro y hombre son más sensibles a la 5-HT que las arterias extracerebrales de estas mismas especies. Además, en las arterias cerebrales la metisergida inhibe no competitivamente a la 5-HT, mientras que en las arterias extracra-neales esta inhibición es competitiva (78). En la arteria basilar de conejo la contracción con 5-HT está mediada por receptores del tipo 5-HT₁ (79). Los estudios llevados a cabo en diferentes laboratorios acerca de la naturaleza de los receptores 5-HT en la arteria basilar de perro muestran fuertes discrepancias, habiéndose propuesto la presencia de receptores 5-HT_{1A} (80), 5-HT₂ (81) e incluso receptores triptaminérgicos con perfil farmacológico no integrable en la clasificación 5-HT₁/5-HT₂, similares a los descritos en el fundus gástrico de rata (82).

La $PGF_{2\alpha}$ es el agonista más efectivo en nuestros experimentos, pero al mismo tiempo el menos potente. La naturaleza de los receptores que median el efecto de la $PGF_{2\alpha}$ en la ACM de cabra no está establecida. Sin embargo, la respuesta a este agonista en la ACM de cabra es muy similar a la obtenida en arterias cerebrales de gato y humanas, donde se ha determinado que los receptores para los prostanoïdes son del tipo "sensible al tromboxano" (TP) (83, 84). Por lo tanto la $PGF_{2\alpha}$ actúa probablemente en la ACM de cabra a

través de un receptor por el que tiene relativamente poca afinidad, lo cual explicaría su baja potencia vasoconstrictora.

6.2.2.- *Importancia del Ca^{2+} extracelular en la contracción de las arterias cerebrales.*

Nuestros experimentos demuestran que la entrada de Ca^{2+} extracelular es necesaria para la contracción de la ACM de cabra. La entrada de Ca^{2+} no se produce de forma pasiva, sino que se requiere la activación de los canales de Ca^{2+} . En un medio desprovisto de Ca^{2+} , la adición de dosis crecientes de CaCl_2 no modificó la tensión isométrica de la ACM. En cambio, el CaCl_2 provocó contracción cuando se despolarizaron previamente las arterias con KCl. Resultados similares se han obtenido en arterias cerebrales de rata (85, 86), perro (60, 69, 87) y humanas (87, 88), resultando manifiesto en todos estos estudios la importancia de la despolarización de las arterias cerebrales para la entrada del Ca^{2+} y la consiguiente contracción. En la arteria mesentérica de perro la eficacia del CaCl_2 en medio despolarizante sin Ca^{2+} es menor que en las arterias cerebrales de la misma especie, lo cual sugiere una intervención menor del Ca^{2+} extracelular en la contracción (60). La potencia vasoconstrictora del CaCl_2 está en relación directa con el grado de despolarización, como se ha demostrado en arterias cerebrales de rata. Cuando las arterias se despolarizan con KCl 40 mM el CaCl_2 produce contracción con $\text{ED}_{50}=4.07 \times 10^{-4}\text{M}$ (85), mientras que cuando se despolarizan con KCl 124 mM el valor de la ED_{50} se reduce a $6.4 \times 10^{-5}\text{M}$ (86). Estos datos indican que una mayor despolarización produce un incremento en la sensibilidad de las arterias cerebrales frente al CaCl_2 .

El presente estudio pone de manifiesto que los diferentes estímulos utilizados no dependen por igual del Ca^{2+}

extracelular para desarrollar la contracción de la ACM de cabra. Aunque tanto la contracción con KCl como con NA, 5-HT y $\text{PGF}_2\alpha$ resultaron inhibidas tras la incubación de las arterias en medio sin Ca^{2+} y en medio sin Ca^{2+} al que se añadió EGTA, se apreciaron notables diferencias en el modo y grado de inhibición de cada estímulo.

La contracción con KCl se redujo por igual en medio sin Ca^{2+} con o sin quelante. La respuesta máxima se mantuvo alrededor del 30% del control pero con dosis de KCl mayores que las utilizadas en el medio normal, lo cual se refleja en el incremento, aproximadamente al doble, de la ED_{50} . Estos resultados sugieren la existencia de una reserva de Ca^{2+} , extra o intracelular, que no se suprime con la incubación en medio sin Ca^{2+} y que se moviliza con altas concentraciones de KCl. La localización extracelular de esta reserva de Ca^{2+} , adherida a la cara externa de la membrana, resultaría improbable si, como se ha sugerido, la acción del EGTA consiste en desorganizar el glicocálix (89).

Por otra parte, el KCl puede provocar, además de la estimulación directa del músculo liso vascular, la liberación de NA u otros neurotransmisores (86), que, a su vez, contraigan las arterias mediante la liberación de reservas intracelulares de Ca^{2+} . Nuestros resultados sugieren que un mecanismo indirecto del KCl como el descrito es improbable en la ACM de cabra, ya que la respuesta a la NA se deprime más que la del KCl en medio sin Ca^{2+} .

La incubación en medio sin Ca^{2+} no afecta por igual a las arterias cerebrales procedentes de diferentes especies animales. No obstante, la despolarización es uno de los estímulos más dependientes del Ca^{2+} extracelular para desarrollar la contracción. La respuesta de las arterias cerebrales de perro, mono, gato y hombre resulta abolida tras su incubación en medio sin Ca^{2+} durante tiempos que oscilan entre 5 minutos y media hora (69, 84, 89, 90). Sin embargo,

la eliminación del Ca^{2+} del medio no siempre tiene consecuencias tan drásticas. Otros autores han descrito una persistencia de la respuesta de las arterias felinas de un 8% respecto al control (91) y de un 35% en arterias piales humanas (88). Este último valor es incluso algo superior al obtenido en nuestros experimentos con arterias cerebrales de cabra. En la mayoría de los estudios sobre el efecto del medio sin Ca^{2+} no se obtiene un curva dosis-efecto para el KCl, sino que se analiza la persistencia de la respuesta a una dosis despolarizante única. De este modo no se considera la posibilidad de que un incremento en la dosis de KCl provoque la superación, al menos parcial, del efecto del medio sin Ca^{2+} . Nuestros experimentos demuestran que tal superación puede ocurrir, siendo ésta la causa de la persistencia de aproximadamente una tercera parte de la respuesta contráctil al KCl en medio sin Ca^{2+} , la cual resulta relativamente alta en comparación con la mayoría de los resultados de otros autores en especies animales distintas.

La NA fue el estímulo más afectado por la eliminación del Ca^{2+} del medio en nuestros experimentos. Con la incubación en medio sin Ca^{2+} , la contracción de la ACM causada por la NA se redujo a un 12% del control, y prácticamente se anuló cuando se añadió EGTA al medio sin Ca^{2+} . A diferencia del KCl, no se produjo modificación en la ED_{50} de la NA, lo cual refleja un mantenimiento de la afinidad del agonista.

En otras especies animales la contracción de las arterias cerebrales con NA también es altamente dependiente del Ca^{2+} extracelular. En las arterias basilares de gato y conejo se anula totalmente la contracción con NA tras la incubación durante 5-10 minutos en medio sin Ca^{2+} (89, 92). En cambio, en las arterias piales humanas persiste un 35% de respuesta a la NA tras la eliminación del Ca^{2+} del medio. Un estudio comparativo realizado con arterias cerebrales de rata y gato puede contener la clave para explicar las diferencias en la resistencia de la respuesta a la NA (76). En

las arterias cerebrales de rata la contracción con NA es relativamente resistente, en comparación con el KCl, y está mediada por receptores α_1 , mientras que en las arterias cerebrales de gato la contracción con NA está mediada por receptores α_2 y se inhibe más que el KCl cuando se elimina el Ca^{2+} del medio. Estos resultados sugieren que las diferencias entre especies animales distintas se establecen debido a que los receptores α_1 movilizan tanto Ca^{2+} extracelular como intracelular, mientras que los receptores α_2 movilizan principalmente Ca^{2+} extracelular. Sería necesario un estudio farmacológico con agonistas y antagonistas específicos de estos subtipos de receptor para determinar si la población de receptores adrenérgicos de la ACM de cabra es predominantemente del tipo α_2 , lo cual motiva su alta dependencia del Ca^{2+} extracelular.

Nuestros experimentos muestran que, en la ACM de cabra, la 5-HT es el estímulo más resistente de los utilizados en medio sin Ca^{2+} . La adición de EGTA al medio sin Ca^{2+} produjo mayor inhibición de la respuesta a la 5-HT que en ausencia del quelante. Posiblemente la 5-HT moviliza una reserva de Ca^{2+} adherida a la cara externa de la membrana celular, que no se lava en medio sin Ca^{2+} pero que sí se elimina con la acción del EGTA. La liberación de reservas intracelulares de Ca^{2+} puede ser la causa del 25% de respuesta permanente incluso en presencia del quelante. En otras especies animales la contracción con 5-HT de las arterias cerebrales es más dependiente del Ca^{2+} extracelular, como en el caso de las arterias basilares de perro y mono (90). Las arterias piales humanas mantienen un 35% de la contracción con 5-HT cuando se incuban en medio sin Ca^{2+} (88). En experimentos con arteria basilar de conejo se ha demostrado que pueden distinguirse dos componentes en la contracción con 5-HT, cuya resistencia al lavado en medio sin Ca^{2+} es muy diferente. Mientras el componente tónico de la contracción se pierde rápidamente en medio sin Ca^{2+} , permanece un componente fásico inicial (93). El tiempo de incubación es un factor

a tener en cuenta cuando se establecen comparaciones de resistencia en medio sin Ca^{2+} . En nuestros experimentos la respuesta a la 5-HT llegó a alcanzar un 64% del control tras 20 minutos de incubación, mientras que se ha descrito un 15% de respuesta a la 5-HT respecto al control en arterias cerebrales de perro, pero tras 1 hora de incubación en medio sin Ca^{2+} (94).

La contracción de la ACM de cabra con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en medio sin Ca^{2+} se redujo a un tercio del control, de modo similar a lo ocurrido con el KCl. Pero, a diferencia del estímulo despolarizante, y en similitud con la NA y la 5-HT, la inclusión de EGTA en el medio sin Ca^{2+} supuso una depresión adicional de la respuesta contráctil, apuntando hacia la intervención de una reserva extracelular de Ca^{2+} , en la cara externa de la membrana, que se elimina con la adición del quelante. La respuesta de las arterias cerebrales a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ se asocia generalmente con una liberación de Ca^{2+} intracelular relativamente importante, dada su resistencia a la incubación en medio sin Ca^{2+} (90). En las arterias cerebrales de perro la persistencia de la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en medio sin Ca^{2+} es del 20-25%, similar a la de la ACM de cabra hallada en nuestros experimentos. En otras especies animales la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$ tras la eliminación del Ca^{2+} extracelular es todavía mayor, alcanzando valores del 63% y 70% respecto al control en arterias cerebrales felinas y humanas (84, 89).

Nuestros resultados ilustran la dependencia del Ca^{2+} extracelular para la contracción de las arterias cerebrales de cabra, en concordancia con los resultados obtenidos en otras especies animales. Dicha dependencia varía cuantitativamente en función del estímulo implicado y se confirma con el hecho de que la reintroducción del Ca^{2+} al medio provoca contracción dosis-dependiente.

6.2.3.- Efecto relajante de los fármacos BECa en las arterias cerebrales.

En nuestros experimentos los fármacos BECa relajaron de forma dosis-dependiente los segmentos precontraídos de ACM de cabra. El efecto relajante no fué cuantitativamente igual para los tres fármacos BECa utilizados. El mayor efecto correspondió a la nimodipina, siguiéndole, por este orden, la nicardipina y el verapamil. Los fármacos BECa fueron más potentes y eficaces relajando las arterias cerebrales precontraídas con KCl que las precontraídas con $\text{PGF}_2\alpha$, de acuerdo con la mayor dependencia del Ca^{2+} extracelular para la contracción con KCl que para la contracción con $\text{PGF}_2\alpha$. Sin embargo, la dependencia del Ca^{2+} extracelular para desarrollar la contracción no es el único factor que puede influir en el efecto de los fármacos BECa. No podemos descartar la posibilidad de que la despolarización con KCl y la activación de receptores para prostanoïdes con $\text{PGF}_2\alpha$ movilicen Ca^{2+} extracelular a través de canales con diferente sensibilidad a los fármacos BECa (88).

La capacidad vasodilatadora de los fármacos BECa ha sido ensayada "in vitro" utilizando arterias cerebrales de diversas especies animales, incluido el hombre. El efecto relajante del verapamil sobre la ACM de cabra precontraída con KCl ha sido descrito con una potencia y efectividad similares a las halladas en nuestros experimentos (71). La nicardipina y el verapamil relajan las arterias cerebrales de perro precontraídas con KCl y con $\text{PGF}_2\alpha$. En concordancia con nuestros resultados, la nicardipina muestra una potencia relajante mayor que el verapamil. En cambio, a diferencia de lo ocurrido en la ACM de cabra, las arterias cerebrales caninas se relajan por igual tanto si se han precontraído con KCl como si el tono activo se ha provocado con $\text{PGF}_2\alpha$, indicando que la movilización de Ca^{2+} activador por la $\text{PGF}_2\alpha$ no es similar en todas las especies animales (70, 95). La nifedipina, otra dihidropiridina al igual que la nicardipi-

na, relaja las arterias cerebrales caninas con más potencia que el verapamil, mientras que el diltiazem es menos potente (70). Por lo tanto, en similitud con nuestros experimentos, las dihidropiridinas poseen mayor potencia vasorrelajante sobre las arterias cerebrales de perro (70), en comparación con fármacos BECa de otros grupos químicos.

La nimodipina relaja la arteria basilar de conejo precontraída con KCl, mostrando un valor de $ED_{50} = 1.7 \times 10^{-10} M$, similar al hallado en nuestros experimentos. Se confirma así que éste es uno de los fármacos BECa con mayor efecto vasorrelajante en arterias cerebrales (93). El D-600 (3-metoxiverapamil) relaja la arteria basilar de conejo precontraída con KCl, con una potencia similar a la mostrada por la nicardipina en nuestros experimentos. Es decir, una ligera modificación en la estructura química del verapamil lo convierte en un fármaco con potencia relajante similar a la de las dihidropiridinas en las arterias cerebrales (92).

El efecto relajante de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales de gato es similar al de las arterias cerebrales caninas, y diferente en parte de la ACM de cabra. En las arterias felinas, la nimodipina y la nifedipina se sitúan entre los fármacos BECa con mayor efecto relajante, mientras que el verapamil y el diltiazem poseen un efecto relajante mucho menor. Los fármacos BECa afectan por igual a la contracción con KCl y $PGF_{2\alpha}$ (91, 96, 97).

Las arterias piales humanas precontraídas con $PGF_{2\alpha}$ son menos sensibles a la relajación con nifedipina y nimodipina que cuando la contracción se provoca con KCl (88). El efecto relajante máximo de la nimodipina sobre la contracción con $PGF_{2\alpha}$ es del 65%, cercano al 73% alcanzado por éste mismo fármaco en la ACM de cabra. También los valores de relajación máxima de la contracción con KCl y de la potencia de los fármacos BECa frente al KCl y la $PGF_{2\alpha}$ guardan gran paralelismo con nuestros resultados. Estas observaciones

confirman que el poder relajante de los fármacos BECa depende, entre otras circunstancias, de la especie animal utilizada.

6.2.4.- *Efecto de los fármacos BECa sobre la contracción de las arterias cerebrales.*

Los resultados obtenidos muestran que los fármacos BECa nicardipina, nimodipina y verapamil inhibieron de forma dosis-dependiente la contracción de la ACM de cabra producida por el CaCl_2 , el KCl, la NA, la 5-HT y la $\text{PGF}_2\alpha$. Se observaron diferencias en el efecto inhibitor según el fármaco BECa y según el estímulo que produce la contracción. La inhibición de las diferentes respuestas contráctiles no fue de tipo competitivo, sino que se redujo tanto la eficacia como la potencia de los estímulos. Esta observación, junto al hecho de que estímulos que producen la contracción mediante mecanismos de acción diferentes resulten inhibidos por un mismo fármaco, son reflejo de la naturaleza funcional del antagonismo que ejercen los fármacos BECa (57).

La contracción producida por el CaCl_2 fue la más inhibida por los tres fármacos BECa utilizados, siendo la nicardipina y la nimodipina más potentes que el verapamil. Estos resultados están de acuerdo con el principal mecanismo de acción propuesto para los fármacos BECa: la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a las células musculares vasculares mediante su interacción con los canales de Ca^{2+} de la membrana celular (17, 18). Resultados similares se han obtenido con arterias cerebrales de perro, en las cuales la nicardipina y la nimodipina reducen la contracción con CaCl_2 en medio despolarizante (87, 95). El verapamil también inhibe la respuesta de las arterias cerebrales de perro y rata al CaCl_2 , pero, en concordancia con nuestros resultados con ACM de cabra, el efecto inhibitor del verapamil es menor que el de las dihidropiridinas (69, 85).

La nicardipina inhibió de modo dosis-dependiente la contracción de la ACM de cabra. La mayor inhibición se produjo sobre la contracción con CaCl, siguiendo, por orden, el KCl, la NA, la PGF_{2α} y la 5-HT. Este orden de inhibición no se corresponde totalmente con el de dependencia del Ca²⁺ extracelular para el desarrollo de la contracción, establecido en este mismo trabajo. La respuesta de la ACM a la NA resultó más inhibida que la respuesta al KCl al eliminar el Ca²⁺ del medio. En cambio, la nicardipina inhibió más la contracción por despolarización que la causada por la amina, lo cual sugiere que el efecto inhibitor de la nicardipina no es función sólo de la cantidad de Ca²⁺ extracelular requerido durante la activación del músculo vascular, sino también de la afinidad y eficacia del fármaco BECa en su interacción con los receptores para dihidropiridinas que existen en la población de canales de Ca²⁺ para cada estímulo. Un resultado similar ha sido descrito en la arteria basilar de cobaya, cuya contracción con 5-HT no se inhibe con nicardipina a pesar de que dicha contracción se atenúa en medio sin Ca²⁺ (98). Por lo tanto, no puede descartarse la existencia de flujos de Ca²⁺ a través de canales relativamente insensibles a los fármacos BECa. En nuestros experimentos, la contracción con 5-HT es la menos afectada por la nicardipina, en correspondencia con la resistencia de esta contracción en medio sin Ca²⁺. Un paralelismo de signo inverso se ha descrito en las arterias cerebrales de perro, en las cuales la relativamente alta dependencia del Ca²⁺ extracelular para la contracción con 5-HT (90) se corresponde con el mayor efecto inhibitor de la nicardipina (99). En esta misma especie la nicardipina atenúa la contracción de las arterias cerebrales con KCl y PGF_{2α}, resultando la despolarización más afectada que el prostanóide (95), lo cual concuerda con nuestros resultados.

El efecto inhibitor de la nimodipina sobre la contracción de la ACM de cabra fue similar al de la nicardipina,

observándose el mismo orden en la sensibilidad de los diferentes estímulos al fármaco BECa. La acción directa del CaCl_2 fue el estímulo más inhibido, siguiéndole, por orden creciente de resistencia, la despolarización con KCl, la NA, la $\text{PGF}_2\alpha$ y la 5-HT. En la arteria basilar de conejo la contracción con 5-HT se produce en dos fases, una de las cuales también es resistente a la incubación con nimodipina, mientras que dicho fármaco BECa afecta marcadamente la contracción de esta misma arteria con KCl (93). La inhibición causada por la nimodipina sobre la contracción de la arteria basilar canina con 5-HT es significativamente mayor que la producida en nuestros experimentos (87), en concordancia con la mayor dependencia del Ca^{2+} extracelular para la contracción de las arterias caninas con 5-HT (90) y la menor dependencia de la ACM de cabra. En contraste con nuestros experimentos, la contracción con NA de la arteria basilar de conejo no se inhibe con nimodipina a dosis que sí atenúan la contracción con 5-HT y KCl (100), a pesar de haberse descrito que la contracción de la arteria basilar de conejo con NA es altamente dependiente del Ca^{2+} extracelular (92). Nuestros resultados, y su comparación con los de otros autores, sugieren que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las arterias cerebrales son particularmente sensibles a las dihidropiridinas, ya que la contracción con KCl es la más inhibida por estos fármacos. En cuanto a la contracción de las arterias cerebrales con agonistas, existen manifiestas variaciones interespecíficas en su inhibición por las dihidropiridinas.

La inhibición causada por el verapamil sobre la contracción de la ACM de cabra fue notablemente menor que la causada por la nicardipina y la nimodipina. No obstante, como excepción, la contracción con 5-HT fue más inhibida por el verapamil que por las dihidropiridinas. La inhibición de la contracción con CaCl_2 , KCl, NA y 5-HT fueron similares entre sí y mayores que la inhibición de la $\text{PGF}_2\alpha$. Nuestros resultados coinciden con los descritos para este fármaco

BECa en su efecto sobre la contracción de la ACM de cabra con KCl, NA y 5-HT (71). En cuanto a otras especies animales, el verapamil inhibe la contracción de las arterias cerebrales caninas, siendo más efectivo sobre la contracción con KCl que sobre la contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$, en concordancia con nuestros resultados (69, 70). Se ha descrito que el verapamil, aparte de su acción bloqueante de la entrada de Ca^{2+} , se comporta como antagonista competitivo de los receptores 5-HT en la aorta de conejo (101). La adición de ambas acciones farmacológicas puede explicar que el verapamil posea mayor efecto inhibitorio sobre la contracción de la ACM de cabra con 5-HT que las dihidropiridinas.

6.3.- Efecto de los fármacos BECa sobre el flujo sanguíneo cerebral (FSC).

6.3.1.- Efecto "per se" de los fármacos BECa.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos muestran que la inyección de los fármacos BECa nicardipina, nifedipina, nimodipina y verapamil directamente en la circulación cerebral de la cabra, a través de la arteria maxilar interna, provocaron un incremento dosis-dependiente del flujo sanguíneo cerebral (FSC). Cuantitativamente, el mayor incremento del FSC se produjo con la nimodipina, siguiéndole, en orden decreciente de potencia, la nifedipina, la nicardipina y el verapamil. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestros experimentos "in vitro", donde también la nimodipina y la nicardipina mostraron mayor efecto vasodilatador que el verapamil.

Mediante la técnica de la ventana craneal, practicada para la observación directa de las arterias piales, se ha demostrado que la nimodipina, en aplicación tópica o infusión intravenosa, produce incremento dosis-dependiente del calibre de las arterias piales de gato (102-104). Durante

intervenciones quirúrgicas para realizar una derivación arterial extra-intracraneal ("bypass EC-IC") se ha observado que la infusión intravenosa de nimodipina también produce incremento en el calibre de las arterias piales humanas (105). Otro fármaco BECa utilizado en nuestros experimentos, la nifedipina, produce dilatación arteriolar dosis-dependiente cuando se aplica tópicamente sobre el córtex cerebral del gato (106). Mediante el uso de fotodiodos y técnicas cinematográficas de alta velocidad se ha podido demostrar que el efecto vasodilatador de los fármacos BECa sobre las arterias cerebrales se acompaña de un aumento en la velocidad de circulación de la sangre, es decir, un incremento en el flujo sanguíneo (107, 108).

Las variaciones de flujo sanguíneo medidas en la arteria maxilar interna con nuestro modelo experimental significan variaciones de la perfusión sanguínea en el hemisferio cerebral ipsilateral, como se ha comprobado mediante la inyección de microesferas radiactivas (68). Por lo tanto, los fármacos BECa utilizados en nuestros experimentos incrementan la perfusión del tejido cerebral. Otros autores han demostrado que la nimodipina produce incremento del flujo sanguíneo cerebral global, determinado mediante la técnica de aclaramiento de ^{133}Xe , en mandriles (109, 110), perros y gatos (111). Además, la utilización de microesferas radiactivas y autorradiografías han permitido establecer los incrementos regionales e incluso locales de flujo sanguíneo cerebral causados por la nimodipina (112-115).

Dado su particular mecanismo de acción, consistente en inhibir la entrada de Ca^{2+} en las células a través de los canales de la membrana, los fármacos BECa pueden afectar tanto a las arterias cerebrales como a cualquier otra parte del lecho vascular, con los consiguientes efectos hemodinámicos. En nuestros experimentos, la inyección de los fármacos BECa en la arteria maxilar interna no produjo cambios en la presión arterial sistémica ni en la frecuencia cardíaca.

Se ha comprobado que la inyección intracarotídea de nimodipina produce incremento del FSC en mandriles y conejos, sin alterar la presión arterial (110, 112). La aplicación tópica de nimodipina sobre el córtex cerebral del gato incrementa el calibre de las arterias piales sin modificar la presión arterial. Por lo tanto, los fármacos BECa, administrados localmente, incrementan el FSC mediante su acción directa sobre las arterias cerebrales, reduciendo la resistencia vascular cerebral, sin llegar a producir alteraciones hemodinámicas sistémicas. En cambio, nuestros experimentos muestran que cuando la nifedipina se administró por vía intravenosa se produjo un descenso de la presión arterial acompañado de incremento en el FSC de magnitud significativamente menor que cuando el fármaco BECa se administró directamente en la circulación cerebral. La infusión intravenosa de nimodipina en mandriles y conejos también produce incremento de la perfusión cerebral a pesar de registrarse una ligera hipotensión (110, 112).

En nuestros experimentos, ninguno de los fármacos BECa utilizados causó cambios en la pO_2 , pCO_2 y pH arteriales durante el incremento de FSC producido tras su administración. Por lo tanto, la vasodilatación causada por los fármacos BECa no se debe a un mecanismo indirecto de activación metabólica, sino a su acción directa sobre las arterias cerebrales. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado que la nimodipina no altera el consumo de O_2 en lonjas de cerebro de rata (111), ni modifica la diferencia arterio-venosa cerebral de O_2 en mandriles (109, 110) y conejos (112), ni altera el consumo cerebral local de glucosa determinado autorradiográficamente en ratas (115). Por último, la actividad electroencefálica, indicadora de actividad neuronal, tampoco se modifica durante la administración de nimodipina a dosis que sí incrementan el FSC en mandriles (110).

6.3.2.- Efecto de los fármacos BECa sobre la reducción farmacológica del FSC.

La inyección intraarterial de NA, 5-HT y $\text{PGF}_{2\alpha}$ directamente en la circulación cerebral de la cabra produjo reducción dosis-dependiente del FSC, sin modificar otros parámetros hemodinámicos ni metabólicos. Nuestros resultados confirman la capacidad vasoconstrictora cerebral de la NA y la 5-HT ya descritas con el mismo modelo experimental (116, 117). El efecto vasoconstrictor de la NA está mediado por receptores α -adrenérgicos (116), mientras que la reducción del FSC producida por la 5-HT se debe a la adición de un efecto directo, a través de receptores triptaminérgicos, más un efecto indirecto, mediante la liberación de NA desde los terminales adrenérgicos cerebrovasculares (117). En nuestros experimentos, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ redujo el FSC con una potencia menor que la NA y la 5-HT, coincidiendo con la menor potencia del prostanoide para contraer las arterias cerebrales de cabra aisladas. La inyección intracarotídea de NA, 5-HT y $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentan la presión de perfusión cerebral en monos Rhesus (118).

La reducción del FSC causada por la NA, la 5-HT y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue inhibida en nuestros experimentos durante la infusión de fármacos BECa. El mayor efecto inhibidor correspondió a la nimodipina, siguiéndole, en orden decreciente, la nifedipina, la nicardipina y el verapamil. En general, la respuesta a la NA fue más inhibida que las respuestas a la 5-HT y la $\text{PGF}_{2\alpha}$, excepto con la nicardipina, que produjo la mayor inhibición sobre la respuesta a la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estos resultados coinciden en gran parte con los obtenidos en nuestros experimentos "in vitro", donde las dihidropiridinas también mostraron mayor efecto inhibidor de la contracción de la ACM que el verapamil.

La aplicación tópica de NA, 5-HT y $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre el córtex cerebral del ratón produce reducción del calibre de

las arterias piales. Este efecto vasoconstrictor se inhibe con la aplicación tópica o intraperitoneal de verapamil y nimodipina. Coincidiendo con nuestros resultados, la inhibición causada por la nimodipina es mayor que la producida por el verapamil (119). El CD-349, una dihidripiridina de reciente síntesis, revierte la reducción de FSC cortical causada por la aplicación tópica de KCl, NA y 5-HT en perros (120).

7.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con el presente trabajo experimental nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Las arterias cerebrales dependen en parte del Ca^{2+} extracelular para su contracción tanto mediante despolarización como mediante la activación de receptores con agonistas. La proporción entre el Ca^{2+} liberado de reservas intracelulares y el Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular depende del estímulo utilizado.
- 2) Los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} actúan sobre las arterias cerebrales provocando tanto relajación en arterias precontraídas como inhibición de la contracción. Por lo tanto, la entrada del Ca^{2+} extracelular necesario para la contracción de las arterias cerebrales se produce a través de canales sensibles a estos fármacos.
- 3) Los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} incrementan el flujo sanguíneo cerebral e inhiben la reducción del flujo sanguíneo cerebral causada farmacológicamente. Este efecto se debe a la acción directa de los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} sobre el músculo liso de las arterias cerebrales, descartándose mecanismos indirectos como la activación metabólica del tejido cerebral o variaciones en parámetros hemodinámicos.
- 4) El efecto de los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} sobre la vasoconstricción cerebral depende, en parte, del estímulo implicado. Esto se debe a que no todos

los estímulos dependen por igual del Ca^{2+} extracelular y, además, a que las poblaciones de canales de Ca^{2+} activadas por los diferentes estímulos no muestran la misma sensibilidad a los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} .

- 5) Los fármacos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} de tipo dihidropiridínico (nicardipina, nifedipina y nimodipina) son más efectivos que el verapamil tanto en su acción vasodilatadora como inhibiendo la vasoconstricción.

8.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- BADEER, H.S. 1984. Cerebral circulation. En: "Cardiovascular Physiology", S. Karger AG, Basilea, pp. 246-54.
- 2.- ALBORCH, E.; G. TORREGROSA; J.B. SALOM; F.J. MIRANDA y M. OROZCO. 1987. Circulación cerebral: mecanismos de regulación y bases fisiopatológicas de la isquemia cerebral. An. C. Intensivos, 2: 45-55.
- 3.- BOLTON, T.B. 1985. Calcium exchange in smooth muscle. En: "Control and Manipulation of Calcium Movement" (J.R. Parratt ed.), Raven Press, Nueva York, pp. 147-68.
- 4.- VAN BREEMEN, C.; P. LEIJTEN; H. YAMAMOTO; P. AAROSON y C. CAUVIN. 1986. Calcium activation of vascular smooth muscle. State of the art lecture. Hypertension, 8 (Supl. II): 89-95.
- 5.- MARIN, J. 1988. Vascular effects of calcium antagonists. Uses in some cerebrovascular disorders. Gen. Pharmac., 19: 295-306.
- 6.- HOAR, P.E.; M.D. PATO y W.G.L. KERRICK. 1985. Myosin light chain phosphatase. Effect on the activation and relaxation of gizzard smooth muscle skinned fibers. J. Biol. Chem., 260: 8760-4.
- 7.- LOUTZENHISER, R.; P. LEYTEN; K. SAIDA; C. VAN BREEMEN. 1985. Calcium compartments and mobilization during contraction of smooth muscle. En: "Calcium and Contractility" (A.K. Grover y E.E. Daniel eds.) The Humana Press Inc., Clifton, pp. 61-92.

- 8.- GARFIELD, R.E. y A.P. SOMLYO. 1985. Structure of smooth muscle. En: "Calcium and Contractility" (A.K. Grover y E.E. Daniel eds.) The Humana Press Inc., Clifton, pp. 1-36.
- 9.- HURWITZ, L. 1986. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26: 225-58.
- 10.- TSIEN, R.W. 1983. Calcium channels in excitable cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 45: 341-58.
- 11.- VAN BREEMEN, C; C. CAUVIN; H. YAMAMOTO y A. ZSCHAUER. 1987. Vascular smooth muscle calcium channels. *J. Cardio-vasc. Pharmacol.*, 10 (Supl. 10): S10-5.
- 12.- HOFMANN, F.; W. NASTAINCZYK; A. ROHRKASTEN; T. SCHENEIDER y M. SIEBER. 1987. Regulation of the L-type calcium channel. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8: 393-8.
- 13.- GLOSSMANN, H. y J. STRIESSNIG. 1988. Structure and pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *ISI Atlas Sci. Pharmacol./1988*, pp. 202-10.
- 14.- PUTNEY, J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7: 1-12.
- 15.- DROOGMANS, G.; B. HIMPENS y R. CASTEELS. 1985. Ca-exchange, Ca-channels and Ca-antagonists. *Experientia*, 41: 895-900.
- 16.- CASTEELS, R.; F. WUYTACK; B. HIMPENS y L. RAEYMAEKERS. 1986. Regulatory systems for the cytoplasmic calcium concentration in smooth muscle. *Biomed. Biochim. Acta*, 45: S147-52.
- 17.- TRIGGLE, D.J. y V.C. SWAMY. 1983. Calcium antagonists. Some chemical-pharmacological aspects. *Circ. Res.*, 52 (Supl. I): 17-28.

- 18.- GODFRAIND, T.; R. MILLER y M. WIBO. 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.*, 38: 321-416.
- 19.- CAUVIN, C.; R. LOUTZENHISER y C. VAN BREEMEN. 1983. Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23: 373-96.
- 20.- KATZ, A.M. 1985. Basic cellular mechanisms of action of the calcium channel blockers. *Am. J. Cardiol.*, 55: 2B-9B.
- 21.- WEINER, D.A. 1988. Calcium channel blockers. *Med. Clin. North Am.*, 72: 83-115.
- 22.- FLECKENSTEIN, A. 1983. History of calcium antagonists. *Circ. Res.*, 52 (Supl. I): 3-16.
- 23.- ANDERSSON, K.E. 1984. Calcium entry blockers. A heterogeneous family of compounds. *Acta Med. Scand.*, (Supl.) 694: 142-52.
- 24.- DOYLE, A.E. 1984. Calcium antagonists. En: "Handbook of Hypertension, Vol. 5: Clinical Pharmacology of Hypertensive Drugs" (A.E. Doyle ed.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 390-402.
- 25.- SPEDDING, M. 1985. Calcium antagonist subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.*, 6: 109-14.
- 26.- SINGH, B.N.; S. BAKY y K. NADEMANEE. 1985. Second-generation calcium antagonists: search for a greater selectivity and versatility. *Am. J. Cardiol.*, 55: 214B-21B.
- 27.- CRUZ, L.J. y B.M. OLIVERA. 1986. Calcium channel antagonists. ω -conotoxin defines a new high affinity site. *J. Biol. Chem.*, 261: 6230-3.

28.- CARSON, J.R.; H.R. ALMOND; M.D. BRANNAN; R.J. CARMOSIN; S.F. FLAIM; A. GILL; M.M. GLEASON; S.L. KEELY; D.W. LUDOVICI; P.M. PITIS; M.C. REBARCHAK y F.J. VILLANI. 1988. 2-ethynylbenzenealkanamines. A new class of calcium entry blockers. J. Med. Chem., 31: 630-6.

29.- QAR, J.; J. BARHANIN; G. ROMNEY; R. HENNING; U. LERCH; R. OEKONOMOPULOS; H. URBACH y M. LAZDUNSKI. 1988. A novel high affinity class of Ca²⁺ channel blockers. Molec. Pharmacol., 33: 363-9.

30.- GODFRAIND, T. y R. MILLER. 1985. Mechanisms of smooth muscle relaxation. En: "Calcium and Contractility" (A.K. Grover y E.E. Daniel eds.) The Humana Press Inc., Clifton, pp. 93-117.

31.- VAN BREEMEN, C.; B.R. FARINAS; P. GERBA y E.D. McNAUGHTON. 1972. Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. Circ. Res., 30: 44-54.

32.- SU, C.M.; F.B. YOUSIF; D.J. TRIGGLE y R.A. JANIS. 1985. Structure-function relationships of 1,4-dihydropyridines: ligand and receptor perspectives. En: "Cardiovascular effects of dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists" (A. Fleckenstein, C. Van Breemen, R. Gross y F. Hoffmeister eds.) Springer Verlag, Berlin, pp. 104-10.

33.- GLOSSMAN, H.; D.R. FERRY; A. GOLL; J. STRIESSNIG y G. ZERNIG. 1985. Calcium channels and calcium channel drugs: recent biochemical and biophysical findings. Arzneim. Forsch./ Drug Res., 35 (II): 2-20.

34.- TRIGGLE, D.J. y R.A. JANIS. 1987. Calcium channel ligands. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 27: 347-69.

- 35.- FROEHNER, S.C. 1988. New insights into the molecular structure of the dihydropyridine sensitive calcium channel. Trends Neurosci., 11: 90-1.
- 36.- HESS, P.; J.B. LANSMAN y R.W. TSIEN. 1985. Mechanism of calcium channel modulation by dihydropyridine agonists and antagonists. En: "Cardiovascular effects of dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists" (A. Fleckenstein, C. Van Breemen, R. Gross y F. Hoffmeister eds.) Springer Verlag, Berlin, pp. 34-55.
- 37.- GODFRAIND, T. 1986. Calcium entry blockade and excitation contraction coupling in the cardiovascular system. Acta Pharmacol. Toxicol., 58 (Supl. II): 5-30.
- 38.- CAUVIN, C.; S. LUKEMAN; J. CAMERON; O. HWANG; K. MEISHERI; H. YAMAMOTO y C. VAN BREEEMEN. 1984. Theoretical bases for vascular selectivity of calcium antagonists. J. Cardiovasc. Pharmacol., 6: S630-S638.
- 39.- VAN ZWIETEN, P.A. 1983. Calcium antagonists, various properties and therapeutic benefit. Progress Pharmacol., 5/2: 1-10.
- 40.- STEINBEREITHNER, K.; I. SCHINDLER; H. BUDKA y J. ZEITELHOFER. 1988. Nimodipine does not reduce brain damage after ventricular fibrillation in an acute pig model. Crit. Care Med., 16: 386.
- 41.- FLEISCHER, J.E.; W.L. LANIER; J.H. MILDE y J.D. MICHELFELDER. 1987. Lidoflazine does not improve neurologic outcome when administered after complete cerebral ischemia in primates. J. Cereb. Blood Flow Metabol., 7: 366-71.

- 42.- VORSTRUP, S.; A. ANDERSEN; N. BLEGVAD y O.B. PAULSON. 1986. Calcium antagonist (PY 108-068) treatment may further decrease flow in ischemic areas in acute stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 6: 222-9.
- 43.- SAVELAND, H.; B. SONESSON; B. LJUNGGREN; T. RYMAN y L. BRANDT. 1988. Does intravenous nimodipine treatment influence cognition in patients subjected to early aneurysm operation? *Acta Neurol. Scand.*, 77: 54-9.
- 44.- NIELSEN, K.C. y C. OWMAN. 1971. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.*, 27: 33-42.
- 45.- WARDLAW, A.C. 1985. Practical statistics for experimental biologists. John Wiley & Sons, Chichester.
- 46.- TALLARIDA, R.J. y R.B. MURRAY. 1987. Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Springer-Verlag, Nueva York.
- 47.- ANDERSON, B. y P.A. JEWELL. 1956. The distribution of carotid and vertebral blood in the brain and spinal cord of the goat. *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 41: 462-74.
- 48.- BALDWIN, B.A. y P.R. BELL. 1963. The anatomy of the cerebral circulation of the sheep and goat. The dynamic distribution of the blood supplied by the carotid and vertebral arteries to the cranial regions. *J. Anat.*, 97: 203-15.
- 49.- REIMANN, C.L.; S. LLUCH y G. GLICK. 1972. Development and evaluation of an experimental model for the study of the cerebral circulation in the unanesthetized goat. *Stroke*, 3: 322-8.

- 50.- DANIEL, P.M.; J.D.K. DAWES y M.M.L. PRICHARD. 1953. Studies of the carotid rete and its associated arteries. Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B237: 173-208.
- 51.- EDELMAN, N.H.; N.S. EPSTEIN; N. CHERNIAK y A.P. FISHMAN. 1972. Control of cerebral blood flow in the goat. Role of the carotid rete. Am. J. Physiol., 223: 615-9.
- 52.- WYATT, D.G. 1984. Blood flow and blood velocity measurement "in vivo" by electromagnetic induction. Med. Biol. Eng. Comput., 22: 193-211.
- 53.- McCULLOCH, J. y L. EDVINSSON. 1984. Cerebrovascular smooth muscle reactivity: a critical appraisal of "in vitro" and "in situ" techniques. J. Cereb. Blood Flow Metabol., 4: 129-39.
- 54.- EDVINSSON, L. y E.T. MacKENZIE. 1977. Amine mechanisms in the cerebral circulation. Pharmacol. Rev., 28: 275-348.
- 55.- PURVES, M.J. 1972. The physiology of the cerebral circulation. Cambridge University Press, Cambridge.
- 56.- BAEZ, S. 1966. Recording of microvascular dimensions with an image-splitter television microscope. J. Appl. Physiol., 21: 299-301.
- 57.- KENAKIN, T.P. 1987. Pharmacological analysis of drug-receptor interaction. Raven Press. Nueva York.
- 58.- BLATTNER, R.; H.G. CLASSEN; H. DEHNERT y H.J. DORING. 1978. Experiments on isolated smooth muscle preparations. Hugo Sachs Elektronik KG, Freiburg.

- 59.- HAYASHI, S. y N. TODA. 1977. Inhibition by Cd^{2+} , verapamil and papaverine of Ca^{2+} induced contractions in isolated cerebral and peripheral arteries of the dog. Br. J. Pharmacol., 60: 35-43.
- 60.- ASANO, M.; K. AOKI; Y. SUZUKI y T. MATSUDA. 1987. Effects of Bay k 8644 and nifedipine on isolated dog cerebral, coronary and mesenteric arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther., 647: 646-56.
- 61.- LUSAMVUKU, N.A.T.; R. SERCOMBE; P. AUBINEAU y J. SEYLAZ. 1979. Correlated electrical and mechanical responses of isolated rabbit pial arteries to some vasoactive drugs. Stroke, 10: 727-32.
- 62.- TSUJI, T. y S. CHIBA. 1985. Blocking effect of diltiazem on thiopentone-induced vasoconstriction in isolated canine internal carotid arteries. J. Cereb. Blood Flow Metabol., 5: 446-50.
- 63.- KENAKIN, T.P. 1984. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. Pharmacol. Rev., 36: 165-222.
- 64.- URQUILLA, P.R.; E.J. MARCO y S. LLUCH. 1975. Pharmacological receptors of the cerebral arteries of the goat. Blood Vessels, 12: 53-67.
- 65.- TODA, N. 1985. Reactivity in human cerebral artery: species variation. Fed. Proc., 44: 326-30.
- 66.- TODA, N. y M. MIYAZAKI. 1984. Heterogeneous responses to vasodilators of dog proximal and distal middle cerebral arteries. J. Cardiovasc. Pharmacol., 6: 1230-7.

- 67.- TODA, N.; T. OKAMURA y M. MIYAZAKI. 1985. Heterogeneity in the response to vasoconstrictors of isolated dog proximal and distal middle cerebral arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, 106: 291-9.
- 68.- MILETICH, D.J.; A.D. IVANKOVIC; R.F. ALBRECHT y E.T. TOYOOKA. 1975. Cerebral hemodynamics following internal maxillary artery ligation in the goat. *J. Appl. Physiol.*, 38: 942-5.
- 69.- WENDLING, W. y C. HAKAL. 1985. Comparative actions of pentobarbital and verapamil on canine cerebral and peripheral arteries "in vitro". *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 49: 189-202.
- 70.- SHIMIZU, K.; T. OHTA y N. TODA. 1980. Evidence for greater susceptibility of isolated dog cerebral arteries to Ca antagonists than peripheral arteries. *Stroke*, 11: 261-5.
- 71.- SALAIKES, M.; J. MARIN; M.L. RICO y C. GONZALEZ. 1983. Effects of verapamil and manganese on the vasoconstrictor responses to noradrenaline, serotonin and potassium in human and goat cerebral arteries. *Biochem. Pharmacol.*, 32: 2711-4.
- 72.- EDVINSSON, L.; L. BRANDT; K.E. ANDERSSON y B. BENGTSSON. 1979. Effect of a calcium antagonist on experimental constriction of human brain vessels. *Surg. Neurol.*, 11: 327-30.
- 73.- TODA, N. 1983. Alpha-adrenergic receptor subtypes in human, monkey and dog cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226: 861-8.
- 74.- SKARBY, T.V.C.; K.E. ANDERSSON y L. EDVINSSON. 1983. Pharmacological characterization of postjunctional α -adrenoceptors in isolated feline cerebral and peripheral arteries. *Acta Physiol. Scand.*, 117: 63-73.

75.- DUCKLES, S.P. y J.A. BEVAN. 1976. Pharmacological characterization of adrenergic receptors of a rabbit cerebral artery "in vitro". J. Pharmacol. Exp. Ther., 197: 371-8.

76.- SKARBY, T.; E.D. HOGESTATT y K.E. ANDERSSON. 1984. Influence of extracellular calcium and nifedipine on α 1- and α 2-adrenoceptor-mediated contractile responses in isolated rat and cat cerebral and mesenteric arteries. Acta Physiol. Scand., 123: 445-56.

77.- ALLEN, G.S.; L.M. HENDERSON; S.N. CHOU y L.A. FRENCH. 1974. Cerebral arterial spasm. Part 1. In vitro contractile activity of vasoactive agents on canine basilar and middle cerebral arteries. J. Neurosurg., 40: 433-41.

78.- LAMAR, J.C. y L. EDVINSSON. 1980. 5-hydroxytryptamine receptors. Contractile activity and mode of inhibition of methysergide in mammalian intracranial and extracranial vessels. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 243: 245-54.

79.- BRADLEY, P.B.; P.P.A. HUMPHREY y R.H. WILLIAMS. 1986. Evidence for the existence of 5-hydroxytryptamine receptors, which are not of the 5-HT₂ type, mediating contraction of rabbit isolated basilar artery. Br. J. Pharmacol., 87: 3-4.

80.- PEROUTKA, S.J.; S. HUANG y G.S. ALLEN. 1986. Canine basilar artery contractions mediated by 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther., 237: 901-6.

81.- MULLER-SCHWEINITZER, E. y G. ENGEL. 1983. Evidence for mediation by 5-HT₂ receptors of 5-hydroxytryptamine-induced contraction of canine basilar artery. Naunyn Schmied./ Arch. Pharmacol., 324: 287-92.

- 82.- COHEN, M.L. y E. COLBERT. 1986. Relationship between receptors mediating serotonin (5-HT) contractions in the canine basilar artery to 5-HT₁, 5-HT₂ and rat stomach fundus 5-HT receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237: 713-8.
- 83.- USKI, T.K. y K.E. ANDERSSON. 1984. Effects of prostanoids on isolated feline cerebral arteries. I. Characterization of the contraction-mediating receptor. *Acta Physiol. Scand.*, 120: 131-6.
- 84.- USKI, T.K.; K.E. ANDERSSON; L. BRANDT y B. LJUNGGREN. 1984. Characterization of the prostanoid receptors and of the contractile effects of prostaglandin F_{2α} in human pial arteries. *Acta Physiol. Scand.*, 121: 369-78.
- 85.- JULOU-SCHAEFFER, G. y J.L. FRESLON. 1987. Compared effects of calcium entry blockers on calcium-induced tension in rat isolated cerebral and peripheral resistance vessels. *Naunyn Schmied./ Arch. Pharmacol.*, 336: 670-6.
- 86.- HOGESTATT, E.D. y K.E. ANDERSSON. 1984. Mechanisms behind the biphasic contractile response to potassium depolarization in isolated rat cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228: 187-95.
- 87.- MULLER-SCHWEINITZER, E. y P. NEUMANN. 1983. In vitro effects of calcium antagonists PN 200-110, nifedipine and nimodipine, on human and canine cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 3: 354-361.
- 88.- BRANDT, L., K.E. ANDERSSON; L. EDVINSSON y B. LJUNGGREN. 1981. Effects of extracellular calcium and of calcium antagonists on the contractile responses of isolated human pial and mesenteric arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1: 339-47.

- 89.- USKI, T.K. y K.E. ANDERSSON. 1984. Effects of prosta-
noids on isolated feline cerebral arteries. II. Roles of
extra- and intracellular calcium for the prostaglandin F_{2α}-
induced contraction. *Acta Physiol. Scand.*, 120: 197-205.
- 90.- SASAKI, T.; N.F. KASSELL y M. ZUCCARELLO. 1986. Depen-
dence of cerebral arterial contractions on intracellularly
stored Ca⁺⁺. *Stroke*, 17: 95-7.
- 91.- ANDERSSON, K.E.; L. EDVINSSON; E.T. MacKENZIE; T. SKAR-
BY y A.R. YOUNG. 1983. Influence of extracellular calcium
and calcium antagonists on contractions induced by potassium
and prostaglandin F_{2α} in isolated cerebral and mesenteric
arteries of the cat. *Br. J. Pharmacol.*, 79: 135-40.
- 92.- McCALDEN, T.A. y J.A. BEVAN. 1981. Sources of activator
calcium in rabbit basilar artery. *Am. J. Physiol.*, 241:
H129-33.
- 93.- TOWART, R. 1981. The selective inhibition of serotonin-
induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth
muscle by calcium-antagonistic dihydropyridines. An investi-
gation of the mechanism of action of nimodipine. *Circ. Res.*,
48: 650-7.
- 94.- TODA, N. 1982. Mechanism of action of carbocyclic
thromboxane A₂ and its interaction with prostaglandin I₂ and
verapamil in isolated arteries.
- 95.- YAMAMOTO, M.; T. OHTA y N. TODA. 1983. Mechanisms of
relaxant action of nifedipine, a new Ca⁺⁺-antagonist, on
isolated dog cerebral and mesenteric arteries. *Stroke*, 14:
270-5.

96.- SKARBY, T.; K.E. ANDERSSON; L. EDVINSSON y D. HOGES-TATT. 1985. Effect of calcium removal and organic calcium entry blockers on contractile responses in isolated feline cerebral and mesenteric arteries. En: "Cerebral Vascular Spasm" (D. Voth y P. Glees eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 139-51.

97.- SJOGREN, A. y L. EDVINSSON. 1986. Vasomotor effects of magnesium: a comparison with nifedipine and verapamil of in vitro reactivity in feline cerebral and peripheral arteries. *Magnesium*, 5: 66-75.

98.- FUJIWARA, S. y H. KURIYAMA. 1983. Nicardipine actions on smooth muscle cells and neuromuscular transmission in the guinea-pig basilar artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 447-55.

99.- NAKAYAMA, K.; J. KURIHARA; Y. MIYAJIMA; K. ISHII y H. KATO. 1985. Calcium antagonistic properties of nicardipine, a dihydropyridine derivative assessed in isolated cerebral arteries and cardiac muscle. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 35 (I): 687-93.

100.- TAKAGI, T.; N. SATAKE y S. SHIBATA. 1983. The inhibitory action of FR 34235 (a new Ca^{2+} entry blocker) as compared to nimodipine and nifedipine on the contractile response to norepinephrine, potassium and 5-hydroxytryptamine in rabbit basilar artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 90: 297-9.

101.- OHASHI, M.; R. KANAI y I. TAKAYANAGI. 1985. Do D600 and diltiazem interact with serotonin receptors in rabbit vascular tissues? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233: 830-5.

102.- AUER, L.M. y M. MOKRY. 1986. Effect of topical nimodipine versus its ethanol-containing vehicle on cat pial arteries. *Stroke*, 17: 225-8.

- 103.- AUER, L.M. 1981. Pial arterial vasodilation by intravenous nimodipine in cats. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 31: 1423-5.
- 104.- TANAKA, K.; F. GOTOH; F. MURAMATSU; Y. FUKUUCHI; T. AMANO; H. OKAYASU y N. SUZUKI. 1980. Effects of nimodipine (Bay-e-9736) on cerebral circulation in cats. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 30: 1494-7.
- 105.- AUER, L.M.; R.W. OBERBAUER y H.V. SCHALK. 1983. Human pial vascular reactions to intravenous nimodipine infusion during EC-IC bypass surgery. *Stroke*, 14: 210-2.
- 106.- BRANDT, L.; B. LJUNGGREN; K.E. ANDERSSON; L. EDVINSSON; E.T. MacKENZIE; A. TAMURA y G. TEASDALE. 1983. Effect of topical application of a calcium antagonist (nifedipine) on feline cortical pial microvasculature under normal conditions and in focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 3: 44-50.
- 107.- KAWAMURA, J.; F. GOTOH; Y. FUKUUCHI; T. AMANO; K. TANAKA; D. UEMATSU; N. SUZUKI; M. KOBARI y K. OBARA. 1988. Effects of the new calcium antagonist 2-nitratopropyl 3-nitratopropyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate on cerebral circulation in cats. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 38: 221-4.
- 108.- SCHMIDLI, J.; G.G. SANTILLAN; M. SAEED; D. PALMIERI y R.J. BING. 1985. The effect of nimodipine, a calcium antagonist, on intracortical arterioles in the cat brain. *Curr. Ther. Res.*, 38: 94-103.
- 109.- McCALDEN, T.A.; R.G. NATH y B.S. THIELE. 1984. The effects of a calcium antagonist (nimodipine) on basal cerebral blood flow and reactivity to various agonists. *Stroke*, 15: 527-30.

110.- HARPER, A.M.; L. CRAIGEN y S. KAZDA. 1981. Effect of the calcium antagonist, nimodipine, on cerebral blood flow and metabolism in the primate. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1: 349-56.

111.- KAZDA, S; B. GARTHOFF; H.P. KRAUSE y K. SCHLOSSMANN. 1982. Cerebrovascular effects of the calcium antagonistic dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 32: 331-8.

112.- HAWS, C.W.; J.K. GOURLEY y D.D. HEISTAD. 1984. Effects of nimodipine on cerebral blood flow. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 24-7.

113.- MOGILNER, M.; S. ASHWALD; P.S. DALE y L.D. LONGO. 1988. Effect of nimodipine on newborn lamb cerebral blood flow. *Biol. Neonate*, 53: 279-89.

114.- MOHAMED, A.A.; J. McCULLOCH; A.D. MENDELOW; G.M. TEASDALE y A.M. HARPER. 1984. Effect of calcium antagonist (nimodipine) on local cerebral blood flow: relationship to arterial blood pressure. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 4: 206-11.

115.- MOHAMED, A.A.; A.D. MENDELOW; G.M. TEASDALE; A.M. HARPER y J. McCULLOCH. 1985. Effect of the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and metabolic coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 5: 26-33.

116.- LLUCH, S.; C. REIMANN y G. GLICK. 1973. Evidence for the direct effect of adrenergic drugs on the cerebral vascular bed of the unanesthetized goat. *Stroke*, 4: 50-6.

117.- DIEGUEZ, G.; B. GOMEZ y S. LLUCH. 1981. Analysis of the cerebrovascular effects of 5-hydroxytryptamine in unanesthetized goats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216: 599-603.

118.- WHITE, R.P.; J.A. HEATON y I.C. DENTON. 1971. Pharmacological comparison of prostaglandin $F_{2\alpha}$, serotonin and norepinephrine on cerebrovascular tone of the monkey. Eur. J. Pharmacol., 15: 300-9.

119.- ROSENBLUM, W.I. 1984. Effects of calcium channel blockers on pial vascular responses to receptor mediated constrictors. Stroke, 15: 284-7.

120.- TSUCHIDA, K.; R. YAMAZAKI; K. KANEKO y H. AIHARA. 1987. Effects of the new calcium antagonist 2-nitratopropyl-3-nitratopropyl-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate on cerebral circulation in dogs. Arzneim. Forsch./ Drug Res., 37 (II): 1239-43.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acuerdo otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Juan B Galim Gualber
la calificación de Arto Cum Laude

Valencia, a 7 de marzo de 1979
El Secretario,

El Presidente,

