

T.D. 304

12

UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

"RECEPTORES PURINERGICOS EN LA CIRCULACION CEREBRAL"

Memoria presentada por  
D. Germán Torregrosa Bernabé  
para aspirar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Burjassot (Valencia), 1989

BIBLIOTECA  
FACULTAT DE C. BIOLÒGQUES  
VALÈNCIA

UMI Number: U607647

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 U607647

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

R. 187.94634

R. 7383

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

C E R T I F I C A :

Que D. Germán TORREGROSA BERNABE, Licenciado con Grado en Ciencias Biológicas, ha realizado, bajo mi dirección en este Centro de Investigación, el trabajo experimental para la elaboración de su Tesis Doctoral titulada "Receptores purinérgicos en la circulación cerebral".

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

A handwritten signature in black ink, reading "Enrique Alborch". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping flourish at the end.

Enrique ALBORCH DOMINGUEZ

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (F.I.S.S.S.), con una Beca de Iniciación a la Investigación en España concedida a D. Germán Torregrosa Bernabé (Exp. 82/117), y con una Ayuda de Investigación (Exp. 86/689).

## AGRADECIMIENTOS

Independientemente de su valor científico, esta Tesis Doctoral debe ser considerada el logro común del mejor equipo profesional y humano al que cualquier investigador pudiera pertenecer. Sus componentes, a los que expresamente deseo mencionar, son:

D. Enrique Alborch Domínguez, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Fisiología, Director del Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia y Director de la presente Tesis Doctoral. Espero que este trabajo compense, aunque sea mínimamente, su incondicional dedicación a mi formación científica.

D. Juan Bautista Salom Sanvalero, Doctor en Ciencias Biológicas. Su férrea autodisciplina y su gran capacidad de trabajo han supuesto el mejor de los estímulos durante estos años.

D. Francisco Javier Miranda Alonso, Médico, Becario del F.I.S.S.S. Su extraordinario sentido práctico será un ejemplo a seguir para siempre.

D. Vicente José Campos Alborg, Médico, becario de la Generalitat Valenciana y D. José Antonio Alabadí Ferrer, Biólogo, becario del F.I.S.S.S. Compañeros incondicionales, su apoyo en todos los aspectos de este trabajo ha sido decisivo.

D. Juan Carlos Terrasa Nicolau, Biólogo. Su participación en los comienzos aseguró la viabilidad del trabajo experimental.

Da María del Carmen Tirados García y Da Lucía Martínez López, Auxiliares de Clínica. Su valiosa ayuda en la realización de los experimentos y la gran cordialidad mostrada hacia mí en todo momento, han convertido el trabajo diario de laboratorio en la tarea más agradable.

Finalmente, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos compañeros y amigos que han contribuido, con sus continuas muestras de apoyo, a que este trabajo llegara a buen fin.

A Reme, mi esposa, y a Germán  
y Marcos, mis hijos, por dar  
sentido a todo

## INDICE

1.- INTRODUCCION .....	1
1.1.- Actividad funcional, metabolismo energético y flujo sanguíneo en el cerebro.....	1
1.2.- Mecanismos de regulación de la circulación cerebral.....	2
1.3.- Formación, metabolismo, transporte y niveles de adenosina en el cerebro.....	4
1.4.- Hipótesis de la adenosina.....	6
1.5.- Hipótesis "purinérgica": Receptores "purinérgicos".....	9
1.6.- Receptores purinérgicos en los vasos sanguíneos.....	14
2.- OBJETIVOS.....	18
3.- MATERIAL Y METODOS.....	19
3.1.- Modelo experimental "in vivo": medición del flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestésiar.....	19
3.1.1.- Consideraciones anatómicas y fisiológicas acerca del lecho vascular cerebral de la cabra.....	19
3.1.2.- Técnica quirúrgica: preparación vascular para la medición del flujo sanguíneo cerebral y de la presión arterial.....	20
3.1.3.- Técnicas de registro y medición.....	23
3.1.4.- Fármacos y soluciones.....	25
3.1.5.- Procedimiento experimental.....	26
3.1.6.- Protocolo experimental.....	27
3.1.6.1.- Curvas dosis-respuesta.....	27
3.1.6.2.- Receptores P <sub>1</sub> .....	28
3.1.6.3.- Receptores P <sub>2</sub> .....	29
3.1.7.- Análisis de los resultados.....	30
3.1.7.1.- Procedimientos estadísticos.....	30
3.2.- Modelo experimental "in vitro": registro de la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales aisladas.....	33

3.2.1.- Preparación experimental.....	33
3.2.2.- Técnicas de registro y medición.....	34
3.2.3.- Fármacos y soluciones.....	35
3.2.4.- Procedimiento experimental.....	35
3.2.5.- Protocolo experimental.....	36
3.2.5.1.- Curvas dosis-respuesta.....	36
3.2.5.2.- Receptores P <sub>1</sub> .....	37
3.2.5.3.- Receptores P <sub>2</sub> .....	37
3.2.6.- Análisis de los resultados.....	38
3.2.6.1.- Procedimientos estadísticos.....	38
4.- RESULTADOS.....	40
4.1.- Efecto de los agonistas purinérgicos sobre el flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros hemodinámicos y meta- bólicos de la cabra sin anestesiar.....	40
4.1.1.- Derivados naturales de la adenosina: AMP, ADP y ATP.....	40
4.1.2.- Derivados sintéticos de la adenosina: 2-cloroadenosina (2-ClAD), 5'-N-etil- carboxamido adenosina (NECA), L-N <sup>6</sup> -(2- fenil isopropil)adenosina (L-PIA), D- N <sup>6</sup> -(2-fenil isopropil)adenosina (D- PIA) y $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta$ -mATP).....	42
4.2.- Efecto de los agonistas purinérgicos sobre la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales de cabra aisladas.....	46
4.2.1.- Derivados naturales de la adenosina: AMP, ADP y ATP.....	46
4.2.2.- Derivados sintéticos de la adenosina: 2-ClAD, NECA, L- y D-PIA, y $\alpha,\beta$ -mATP.....	48
4.3.- Estudios con fármacos antagonistas de los receptores purinérgicos.....	50
4.3.1.- Receptores P <sub>1</sub> .....	50
4.3.1.1.- Estudios "in vivo".....	50
4.3.1.2.- Estudios "in vitro".....	54
4.3.2.- Receptores P <sub>2</sub> .....	55

4.3.2.1.- Estudios "in vivo".....	55
4.3.2.2.- Estudios "in vitro".....	56
FIGURAS.....	58
TABLAS.....	95
5.- DISCUSION.....	119
5.1.- Consideraciones acerca de la metodología empleada.....	119
5.2.- Efecto de los agonistas purinérgicos naturales sobre la circulación cerebral.....	120
5.3.- Efecto de los agonistas purinérgicos sintéticos sobre la circulación cerebral.....	127
5.4.- Efecto de los antagonistas de los recep- tores purinérgicos.....	131
5.4.1.- Receptores P <sub>1</sub> .....	131
5.4.2.- Receptores P <sub>2</sub> .....	138
6.- CONCLUSIONES.....	143
7.- BIBLIOGRAFIA .....	145

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- Actividad funcional, metabolismo energético y flujo sanguíneo en el cerebro.

Los tejidos que realizan trabajo físico, químico o ambos (corazón, riñón y músculo esquelético) exhiben una estrecha correlación entre el metabolismo energético y el nivel de actividad funcional. La existencia de una relación semejante en los tejidos del sistema nervioso central ha sido más difícil de probar, en parte por la incertidumbre acerca de la naturaleza del trabajo asociado con la actividad nerviosa, pero fundamentalmente por la dificultad para evaluar los niveles de actividad metabólica y funcional en un mismo componente del cerebro en un tiempo determinado.

Con el desarrollo de métodos cada vez más precisos para la evaluación de los niveles metabólicos en áreas discretas del cerebro, se ha demostrado de manera inequívoca la existencia de una estrecha relación entre la actividad funcional y el metabolismo energético en el cerebro (Plum et al., 1976; Sokoloff, 1977). Paralelamente al desarrollo de estas técnicas, se han puesto a punto procedimientos cada vez más fiables para la medición del flujo sanguíneo en las distintas estructuras cerebrales. La combinación de algunos de estos métodos con los utilizados para evaluar el metabolismo cerebral, han demostrado fehacientemente la relación existente entre el metabolismo energético y el flujo sanguíneo en el cerebro (Des Rosiers et al., 1974). De hecho, el coeficiente de correlación lineal flujo sanguíneo/metabolismo cerebral no sufre variaciones sustanciales en condiciones tales como la anestesia (Sokoloff, 1978) o la acidosis metabólica (Kuschinsky et al., 1981). Por lo tanto, las estructuras cerebrales están más o menos perfundidas en proporción a sus demandas metabólicas, las cuales a su vez se encuentran en relación directa con la actividad funcional.

En la premisa que se acaba de enunciar se encuentra implícita una de las principales características de la circulación cerebral: la existencia de mecanismos precisos que regulan el caudal sanguíneo que reciben las distintas estructuras cerebrales en función de su estado de activación. La necesidad de que existan tales mecanismos se hace aún más evidente si se tiene en cuenta que el cerebro, a diferencia del músculo esquelético, no almacena glucosa, y por tanto requiere un flujo sanguíneo continuo.

### 1.2.- Mecanismos de regulación de la circulación cerebral.

La regulación del flujo sanguíneo cerebral es un importante mecanismo homeostático que asegura el aporte constante de oxígeno y nutrientes al cerebro. Dicho mecanismo cumple su función incluso en condiciones en las que algunos parámetros hemodinámicos y metabólicos están alterados. A la tendencia del lecho vascular cerebral a mantener constante el flujo sanguíneo frente a cambios de presión arterial se denomina "autorregulación" (Lassen, 1959; Harper, 1966).

La autorregulación del flujo sanguíneo cerebral se lleva a cabo mediante la integración de tres tipos de mecanismos: neurogénicos, miogénicos y metabólicos (Figura 1). Si bien es cierto que existe un acuerdo generalizado sobre la existencia de estos mecanismos, el debate acerca de la influencia relativa de cada uno de ellos permanece abierto. A continuación vamos a centrar la atención en los factores de tipo metabólico.

La existencia de una regulación intrínseca de la circulación cerebral es aceptada hoy de forma generalizada. Tal regulación está implícita en el fenómeno de la autorregulación y en el hallazgo, repetidamente demostrado, de que el flujo sanguíneo cerebral está estrechamente acoplado a la actividad funcional cerebral. La imposibilidad de demostrar de forma concluyente el significado funcional de la inerva-

ción perivascular de las arterias cerebrales, ha conducido a la opinión ampliamente difundida de que la regulación del flujo sanguíneo cerebral está mediada principalmente por los productos del metabolismo energético cerebral. Esta hipótesis, formulada primeramente por Roy y Sherrington en 1890, ha sido reforzada por la evidencia experimental de que la mayoría de estos productos tienen efecto vasodilatador en la circulación cerebral.

Para que una sustancia sea considerada mediador metabólico en la circulación cerebral debe cumplir los siguientes requisitos:

a) Debe ser un potente dilatador de los vasos de resistencia cerebrales.

b) El tejido cerebral debe ser capaz de producir el mediador en condiciones en las que el flujo sanguíneo y el metabolismo cerebrales estén alterados.

c) Las concentraciones del mediador alcanzadas en las regiones perivasculares deben ser suficientes para producir una vasodilatación de la misma magnitud que la observada con la estimulación metabólica.

d) La duración y magnitud del incremento de la sustancia vasodilatadora deben ir paralelos al incremento del flujo sanguíneo cerebral inducido metabólicamente.

e) Los potenciadores del mediador deben causar incremento del flujo sanguíneo cerebral, mientras que los inhibidores deben producir una disminución del mismo.

Factores como  $H^+$ ,  $CO_2$ , lactato, etc. han sido propuestos como mediadores metabólicos que ajustan el flujo sanguíneo al metabolismo cerebral. No obstante, ninguno de estos factores cumple con todos los criterios mencionados. Sin embargo, en la actualidad existen evidencias experimentales suficientes para suponer que la adenosina está implicada en la regulación de la resistencia vascular cerebral (Winn et al., 1981a).

### 1.3.- Formación, metabolismo, transporte y niveles de adenosina en el cerebro.

En el sistema nervioso central de mamíferos, las purinas y sus correspondientes nucleósidos se sintetizan primariamente en forma de nucleótidos. La adenosina puede formarse a continuación a través de varias rutas metabólicas, siendo las más importantes la desfosforilación del 5'-AMP por la 5'-nucleotidasa, y a partir de la S-adenosilhomocisteína (SAH) por la acción de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (Snyder, 1985). Probablemente el primero de estos mecanismos es el principal responsable de la producción de adenosina en el cerebro.

Los estudios sobre la distribución de la 5'-nucleotidasa indican que este enzima está principalmente localizado en la membrana celular como un ectoenzima, aunque también está presente intracelularmente en una forma soluble. Esto indica el doble origen de la adenosina en el cerebro: intra y extracelular. Las dos vías intracelulares de producción de adenosina se esquematizan en la Figura 2. Una de ellas se inicia con la formación de SAH a partir de S-adenosilmetionina, en el transcurso de reacciones de transmetilación de vital importancia para el metabolismo celular. Por este motivo la SAH está en continua producción, constituyendo el substrato para la SAH hidrolasa, que cataliza su hidrólisis a homocisteína y adenosina. Este nucleósido puede formarse también por una segunda vía que consiste en la desfosforilación de AMP por la forma soluble intracelular de la 5'-nucleotidasa (Fredholm y Sollevi, 1986).

Extracelularmente, la adenosina se origina a partir de los nucleótidos de la adenina por la acción de la ecto-5'-nucleotidasa. En estudios de distribución subcelular se ha demostrado que la actividad enzimática está asociada con la fracción membranosa, y más concretamente con la fracción de membrana sináptica (Nagata et al., 1984). El enzima ha sido

también detectado en la membrana de los pies astrocitarios que rodean a los vasos cerebrales (Kreutzberg et al., 1978). La cuestión menos conocida es la procedencia de los nucleótidos. En la Figura 3 se esquematizan los posibles orígenes de los mismos. Una fuente son las células endoteliales, cuyas bien provistas reservas de nucleótidos pueden liberarse en respuesta a varios estímulos, tales como hipoxia (Pearson y Gordon, 1979). Además, los nucleótidos pueden ser liberados al torrente sanguíneo por las plaquetas en virtud de su extremada fragilidad, y también pueden difundir fuera de las células cuando su permeabilidad resulta aumentada, tal y como ocurre durante la despolarización (Abood et al., 1962; Fredholm et al., 1982). Por último, los nucleótidos de la adenina, y concretamente el ATP, pueden proceder de las terminaciones nerviosas durante la neurotransmisión, ya que, como está demostrado, el ATP se almacena en las mismas vesículas sinápticas que los neurotransmisores primarios, noradrenalina y acetilcolina (Cuello, 1982).

Por otra parte, dos son los mecanismos por los que se regulan los niveles extracelulares de adenosina en el cerebro: la degradación de adenosina a inosina, que realiza el enzima adenosina desaminasa, y la existencia de un sistema de transporte/captación para la adenosina.

El enzima adenosina desaminasa exhibe marcadas diferencias interespecíficas tanto en su localización inmunohistoquímica, como en los niveles absolutos de actividad enzimática (Yamamoto et al., 1987). El enzima se encuentra asociado al ectoenzima 5'-nucleotidasa, presentando ambos sitios activos dirigidos hacia el espacio extracelular en sinaptosomas de rata (Franco et al., 1986).

La adenosina puede ser transportada hacia afuera y hacia adentro de las células. A bajas concentraciones la mayor parte de este transporte se lleva a cabo por difusión

facilitada, mientras que a altas concentraciones se realiza por difusión pasiva (Fox y Kelley, 1978). El transportador de adenosina está actualmente bien caracterizado (Young y Jarvis, 1985). En condiciones fisiológicas el transportador parece realizar fundamentalmente funciones de captación. Una vez ha sido captada, la adenosina es fosforilada por la adenosina kinasa o, a concentraciones elevadas, puede conjugarse con la L-homocisteína para formar SAH.

La determinación de los niveles cerebrales de adenosina resulta difícil debido a las dificultades metodológicas, así como al hecho de que estos niveles varían dependiendo del estado funcional del organismo (Snyder, 1985). Los resultados obtenidos en estudios en los que el tejido cerebral se congela a través de la duramadre antes de que la circulación quede interrumpida, indican que la concentración de adenosina no excede de 1  $\mu\text{mol/kg}$  (Nordström et al., 1977; Rehncrona et al., 1978), valor que coincide con el obtenido mediante la técnica de diálisis cerebral (Zetterström et al., 1982). En experimentos más recientes con una técnica que obvia parte de los inconvenientes inherentes a la de la diálisis cerebral (trauma tisular y oclusión vascular), se han registrado unos niveles de adenosina de unos dos órdenes de magnitud menores (30-50 nM) (Phillis et al., 1987).

#### 1.4.- Hipótesis de la adenosina.

Desde hace mucho tiempo se venía considerando al ATP exclusivamente como una fuente de energía intracelular. Los experimentos de Drury y Szent-Györgyi en 1929 y de Green y Stoner en 1950 demostraron que los nucleósidos y nucleótidos purínicos tenían además una potente acción extracelular sobre tejidos excitables tales como el miocardio o el músculo liso vascular. Un avance importante en el conocimiento de los efectos fisiológicos de estos compuestos lo constituyó el trabajo publicado por Berne en 1963, en el cual se emitió por primera vez la hipótesis según la cual la

adenosina interviene en el acoplamiento entre el flujo sanguíneo coronario y la actividad del músculo cardíaco, ya que los productos de degradación de la adenosina, inosina e hipoxantina, aparecen durante las situaciones de hipoxia o isquemia miocárdicas.

Un hecho similar al que acabamos de describir puesto de manifiesto a nivel cerebral, hizo surgir la hipótesis de que la adenosina podría ser uno de los factores responsables del acoplamiento entre el flujo sanguíneo y el metabolismo en el cerebro. Efectivamente, los niveles cerebrales de adenosina aumentan marcadamente durante las situaciones de isquemia (Deuticke y Gerlach, 1966; Berne et al., 1974; Winn et al., 1979), hipoxia (Winn et al., 1981b; Phillis et al., 1987), hipotensión mantenida (Winn et al., 1985) y durante las fases de actividad epiléptica inducida experimentalmente (Schrader et al., 1980). Además, se han registrado incrementos en la concentración de adenosina en el líquido cefalorraquídeo y en el líquido intersticial cerebral durante hipoxia, isquemia y hemorragia (Berne et al., 1974; Zetterström et al., 1982; Van Wylen et al., 1986).

La administración "in vivo" de los potentes inhibidores de la adenosina desaminasa, desoxicoformicina y eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina (EHNA), incrementa marcadamente los niveles endógenos de adenosina (Zetterström et al., 1982) y potencian la hiperemia cerebral inducida por un episodio breve de anoxia (Phillis et al., 1985). Además, la infusión de adenosina desaminasa en el líquido cefalorraquídeo reduce significativamente la dilatación de los vasos piales inducida por hipoxia (Kontos y Wei, 1981). De estos hallazgos se deduce que la adenosina desaminasa está implicada en la fisiología de la adenosina, y que este nucleósido, según la hipótesis conocida, juega un papel importante en la autorregulación cerebral en situación de hipoxia. Una confirmación adicional de este último supuesto reside en el hecho de que la papaverina y el dipiridamol, sustancias que inhiben la

captación de adenosina permitiendo su acumulación en el espacio extracelular (Phillis y Wu, 1982), además de tener propiedades vasodilatadoras (Heistad et al., 1981), potencian la hiperemia cerebral consecuente a un episodio de anoxia (Phillis et al., 1984).

A la consolidación de la hipótesis de la adenosina han contribuido decisivamente las investigaciones acerca de los efectos de este nucleósido sobre la circulación cerebral, así como las destinadas a identificar los receptores que median dichos efectos.

Los experimentos realizados para investigar la reactividad del lecho vascular cerebral frente a la adenosina y sus nucleótidos se han llevado a cabo utilizando diferentes tipos de modelos experimentales. Los resultados obtenidos "in vivo" son contradictorios, ya que mientras que algunos autores registran un incremento en el flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la administración (generalmente intracarotídea) de la adenosina y sus nucleótidos (Kozniowska et al., 1975; Forrester et al., 1979; Heistad et al., 1981; Sollevi et al., 1987), otros no encuentran variaciones en este parámetro (Buyniski y Rapela, 1969; Berne et al., 1974; Heistad et al., 1981; Boarini et al., 1984). Los resultados obtenidos "in vitro" e "in situ" son más homogéneos, habiéndose observado que la adenosina y sus nucleótidos relajan las arterias cerebrales aisladas previamente contraídas (Toda, 1974; Urquilla et al., 1976; Hardebo y Edvinsson, 1979; Edvinsson y Fredholm, 1983; Salaíces et al., 1985; Hardebo et al., 1987; McBean et al., 1988), y que incrementan el diámetro de las arterias piales al ser aplicados perivascularmente (Berne et al., 1974; Whal y Kuschinsky, 1976; Heistad et al., 1981).

En resumen, la adenosina parece satisfacer varios de los criterios necesarios para ser considerada un mediador metabólico en la regulación de la circulación cerebral: es

un vasodilatador cerebral; el cerebro produce adenosina en condiciones en las que el flujo, el metabolismo o ambos están alterados; los niveles cerebrales basales de adenosina parecen estar dentro del rango vasoactivo; y por último, los potenciadores e inhibidores de la adenosina modifican el flujo sanguíneo cerebral.

#### 1.5.- Hipótesis "purinérgica": Receptores "purinérgicos".

Investigaciones realizadas en las dos últimas décadas han ido consolidando la hipótesis de que un compuesto purínico, posiblemente el ATP, podría ser el neurotransmisor de un tercer componente del sistema nervioso autónomo de naturaleza diferente a los componentes adrenérgico y colinérgico (Campbell, 1970; Burnstock et al., 1970). Estos nervios se encuentran representados en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de especies, y han sido identificados en órganos tales como pulmón o vejiga urinaria. De acuerdo con los criterios para la aceptación de un nuevo neurotransmisor, se ha propuesto que la sustancia activa liberada al menos por algunos de estos nervios es el ATP. Las evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis indican que el ATP es sintetizado, almacenado y liberado por los nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos que controlan el músculo liso gastrointestinal, y que reproduce los efectos de la estimulación nerviosa de estos músculos. Estos nervios se denominaron "purinérgicos" (Burnstock, 1972).

Uno de los avances más importantes en la consolidación de esta hipótesis lo constituyó la identificación de los receptores "purinérgicos". Una amplia variedad de tejidos sufren cambios en su estado funcional cuando se exponen a la adenosina y sus nucleótidos; aquellos componentes moleculares del tejido efector que primero interaccionan con los compuestos de la adenina para producir la respuesta se han denominado receptores "purinérgicos" (Burnstock, 1976). En un principio, y dada la ausencia de estudios realizados

sobre el aislamiento y la caracterización química de los mismos, su identificación se realizó en base a los dos procedimientos farmacológicos clásicos: la obtención de las curvas dosis-respuesta para una serie de agonistas con el establecimiento del consiguiente orden de potencia de los mismos, y la determinación de la potencia de sustancias antagonistas para inhibir la respuesta a estos agonistas.

En 1978 Burnstock propuso la existencia de dos tipos de receptores purinérgicos:  $P_1$  y  $P_2$ . Los criterios en base a los cuales se estableció esta clasificación eran, en resumen, los siguientes: los receptores  $P_1$  son más sensibles a la adenosina y al AMP que al ADP y al ATP, actúan vía el sistema de la adenilato ciclasa, y son antagonizados competitivamente por metilxantinas tales como la teofilina y la cafeína. Los receptores  $P_2$  son particularmente sensibles al ATP y al ADP, no actúan a través del sistema de la adenilato ciclasa, y no son antagonizados por las metilxantinas.

Posteriormente, varios laboratorios desarrollaron con éxito la síntesis de agonistas y antagonistas radiactivos de la adenosina para el estudio de sus receptores (Bruns et al., 1980; Schwabe y Trost, 1980; Williams y Risley, 1980; Wu et al., 1980). El empleo de los potentes agonistas y antagonistas de la adenosina surgidos de estas investigaciones en el estudio del sistema de la adenilato ciclasa, así como en estudios de estructura-actividad, ha puesto de manifiesto la existencia de cuatro tipos de receptores para la adenosina y que, por lo tanto, pueden considerarse como subtipos de los receptores  $P_1$ : receptores  $A_1$ , cuya activación inhibe la actividad de la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc, y receptores  $A_2$ , cuya activación produce el efecto contrario. A su vez, entre los receptores  $A_2$  se puede distinguir un receptor  $A_2$  de baja afinidad y un receptor  $A_2$  de alta afinidad. Por último, parece existir un receptor P, localizado a diferencia de los anteriores intracelularmente, estrechamente ligado a la subunidad catalítica

de la adenilato ciclasa y cuya activación por altas concentraciones de adenosina puede inhibir la formación de AMPc (Daly, 1985).

La identificación farmacológica de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se basa en la potencia relativa de una serie de agonistas (Tabla I). Desde este punto de vista, el orden de potencia de los agonistas para los receptores A<sub>1</sub> es el siguiente: L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA)>2-cloroadenosina (2-ClAD)>adenosina>5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA)>D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA), y para los receptores A<sub>2</sub> el siguiente: NECA>2-ClAD>L-PIA>D-PIA. En resumen, puede decirse que para los receptores A<sub>1</sub> algunos derivados N<sup>6</sup>- de la adenosina son los agonistas más potentes, mostrando además una marcada estereoespecificidad, ya que L-PIA es mucho más potente (50-100 veces) que D-PIA. Para los receptores A<sub>2</sub>, la potencia de los derivados de la adenosina 5'-carboxamido es muy superior a la de los derivados 2-cloro o N<sup>6</sup>-, siendo el isómero L-PIA ligeramente (5-10 veces) más potente que el isómero D-PIA (Burnstock, 1984; Daly, 1985; Williams, 1987).

En cuanto a los antagonistas de las respuestas P<sub>1</sub>, los análisis de la relación estructura-actividad demuestran que las sustituciones 1,3-dipropil en la molécula de xantina aumentan la potencia con respecto a las sustituciones 1,3-dimetil, y que la adición de un radical 8-fenil produce igualmente un aumento considerable de la potencia. Para los receptores A<sub>1</sub>, que han sido los más estudiados, el orden de potencia de algunos de estos antagonistas es el siguiente: 1,3-dipropil-8-(2-amino-4-cloro)-fenil xantina (PACPX)>1,3-dipropil-8-fenil xantina (DPPX)>1,3-dimetil-8-fenil xantina (8-fenilteofilina)>1,3-dimetilxantina (teofilina) (Fredholm y Persson, 1982; Bruns et al., 1980; Daly, 1985).

La identificación de los receptores P<sub>2</sub> es, aún en la actualidad, más difícil que la de los P<sub>1</sub>. Esto se debe a la

falta de antagonistas específicos que puedan ser de uso general. Tradicionalmente se han empleado sustancias tales como guinidina, apamina, 2,2'-piridil isatogen, etc., pero ninguna de ellas es un verdadero antagonista y todas conllevan efectos inespecíficos (Burnstock y Brown, 1981). Uno de los métodos más prometedores parece ser la utilización del arilazidoaminopropionil ATP (ANAPP<sub>3</sub>), sustancia usada para el marcaje por fotoafinidad de la miosina y de la adenosintrifosfatasa F<sub>1</sub> mitocondrial (Jeng y Guillory, 1975), que bloquea la respuesta contráctil del vas deferens de cobayo inducida por el ATP (Hogaboom et al., 1980). Ultimamente se ha propuesto la técnica denominada "desensibilización de los receptores P<sub>2</sub> con el análogo lentamente degradable del ATP, α,β-metilén ATP", habiéndose observado que bajas concentraciones de esta sustancia bloquean las respuestas de tipo P<sub>2</sub> en la vejiga de cobayo (Kasakov y Burnstock, 1982).

Como consecuencia de la falta de antagonistas de las respuestas de tipo P<sub>2</sub>, la identificación de estos receptores está basada actualmente en la potencia relativa entre diferentes derivados sintéticos del ATP (Tabla I). Se distinguen fundamentalmente dos subtipos: receptores P<sub>2x</sub>, cuya activación desencadena respuestas excitadoras, y receptores P<sub>2y</sub>, cuya activación provoca respuestas inhibitoras. Para los receptores P<sub>2x</sub> el orden de potencia de los agonistas es el siguiente: α,β-metilén ATP=β,γ-metilén ATP>ATP>2-metil-tío ATP, mientras que para los receptores P<sub>2y</sub> es el siguiente: 2-metil-tío ATP>>ATP>β,γ-metilén ATP=α,β-metilén ATP (Burnstock y Kennedy, 1985a).

Además de las investigaciones con agonistas y antagonistas cada vez más potentes, otros hallazgos experimentales fundamentan la clasificación de los receptores purinérgicos en los tipos P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. Así por ejemplo, la interacción de los agonistas con los receptores P<sub>2</sub> puede dar lugar a la estimulación de la síntesis de prostaglandinas. Desde el trabajo original de Needleman y colaboradores en 1974, en el cual se

constató la capacidad del ADP y del ATP para estimular la síntesis de prostaglandinas en diversos órganos aislados, resultados experimentales posteriores apoyan esta relación agonistas P<sub>2</sub>/prostaglandinas: la indometacina, potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, bloquea las respuestas inhibitoras del ATP en varios tejidos (Burnstock y Brown, 1981).

Por otra parte, la degradación extracelular del ATP es rápida y en ella intervienen diferentes enzimas. Esto significa que algunas de las acciones del ADP y el ATP pueden estar mediadas por los receptores P<sub>1</sub> después de su degradación a adenosina. En aquellos tejidos en los que la adenosina y el ATP tienen efectos opuestos (por ejemplo en la vejiga, en la que el ATP contrae y la adenosina relaja), es fácil establecer que el ATP tiene un efecto directo "per se". Sin embargo, en aquellos tejidos en los que la adenosina y el ATP tienen el mismo efecto (por ejemplo en la vena porta, en la que ambos tienen efecto relajante), podría suponerse un efecto indirecto del ATP a través de la adenosina. Si el ATP es menos potente que la adenosina y además su efecto es bloqueado por las metilxantinas, existe la confirmación de la existencia de dicho efecto indirecto (Burnstock, 1984).

En resumen, la identificación farmacológica de los receptores purinérgicos se basa en los siguientes criterios:

1.- Los receptores P<sub>1</sub> son más sensibles a la adenosina y al AMP que al ADP y al ATP, mientras que con los receptores P<sub>2</sub> sucede lo contrario.

2.- Las respuestas de tipo P<sub>1</sub> son bloqueadas competitivamente por derivados xantínicos. El bloqueo específico de las respuestas de tipo P<sub>2</sub> aún es un tema controvertido.

3.- La activación de los receptores P<sub>1</sub> puede dar lugar a la inhibición (receptores A<sub>1</sub>) o a la estimulación (receptores A<sub>2</sub>) del sistema de la adenilato ciclasa, con los

consiguientes cambios en los niveles de AMPc.

4.- Los receptores P<sub>1</sub> muestran una marcada estereoespecificidad.

5.- La activación de los receptores P<sub>2</sub> puede dar lugar a la síntesis de prostaglandinas.

6.- Algunas de las acciones del ADP y el ATP pueden estar mediadas por los receptores P<sub>1</sub> después de su degradación a AMP y adenosina.

### 1.6.- Receptores purinérgicos en los vasos sanguíneos.

La identificación de los receptores purinérgicos y sus implicaciones fisiológicas han sido objeto de investigación en una amplia variedad de tejidos (Daly, 1985; Fredholm y Sollevi, 1986; Gordon, 1986; Williams, 1987). En cuanto a los vasos sanguíneos, numerosas evidencias experimentales indican la existencia de receptores P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> en diferentes lechos vasculares. Postsinápticamente parece existir un receptor P<sub>1</sub> con el cual interacciona la adenosina para producir vasodilatación, siendo este efecto bloqueado por las metilxantinas. Una excepción a este hecho generalizado se encuentra en la circulación renal, en donde la adenosina produce vasoconstricción. El receptor está localizado en la superficie de las células musculares lisas, ya que el efecto de la adenosina es potenciado por los inhibidores de la captación de adenosina tales como dipiridamol o papaverina. Además, parece ser del subtipo A<sub>2</sub> puesto que el derivado NECA es más potente que el derivado L-PIA, y su activación conduce a la acumulación de AMPc. Este último hecho se ha registrado también en las células endoteliales en cultivo, lo cual indica que tales células están equipadas igualmente con receptores para la adenosina del subtipo A<sub>2</sub>. Parece existir además un receptor P<sub>1</sub> localizado presinápticamente, a través del cual la adenosina inhibe la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas perivasculares. Este mecanismo podría contribuir a las propiedades vasodilatadoras de la adenosina, ya que la influen-

cia de los nervios simpáticos vasoconstrictores resulta limitada en presencia del nucleósido.

Por lo que respecta a los receptores  $P_2$ , parece existir un receptor  $P_{2x}$  en las células musculares lisas vasculares, cuya activación por el ATP produce vasoconstricción. Este nucleótido puede también actuar sobre un receptor  $P_{2y}$  localizado en las células endoteliales, cuya activación conduce a la estimulación de la producción de un factor relajante de origen endotelial, el cual a su vez produce la relajación de las células musculares lisas, con la consiguiente vasodilatación (Su, 1981; Burnstock, 1984; Burnstock y Kennedy, 1985b; Fredholm y Sollevi, 1986).

La identificación farmacológica de receptores purinérgicos en el lecho vascular cerebral se ha polarizado en los estudios "in vitro" dada la relativa facilidad con la que pueden construirse las curvas dosis-respuesta y estudiarse los efectos de agonistas y antagonistas. Más aún, los estudios se han centrado prácticamente en la identificación de receptores para la adenosina ( $P_1$ ), posiblemente porque, como hemos mencionado ya, no existen antagonistas específicos de las respuestas de tipo  $P_2$  que puedan ser de uso general.

Respecto del efecto de la adenosina y sus derivados sobre arterias cerebrales aisladas, los resultados obtenidos por diferentes investigadores son ampliamente coincidentes, habiéndose observado que relajan en forma dosis-dependiente los segmentos arteriales previamente contraídos (Toda, 1974; Urquilla et al., 1976; Hardebo y Edvinsson, 1979; Edvinsson y Fredholm, 1983; Salaices et al., 1985; Hardebo et al., 1987; McBean et al., 1988). También tienen efecto relajante los derivados sintéticos de la adenosina NECA, 2-ClAD y los isómeros D- y L-PIA (Edvinsson y Fredholm, 1983; Hardebo et al., 1987; McBean et al., 1988). En cuanto al orden de potencia de estos agonistas, el ATP es más potente que la

adenosina, siendo el efecto del AMP y del ADP objeto de controversia: según algunos resultados, ambos nucleótidos son equipotentes con la adenosina (Hardebo y Edvinsson, 1979); según otros, la potencia relajante del ADP es superior a la del AMP, y la de éste a la de la adenosina (Urquilla et al., 1976). El derivado NECA es más potente que 2-ClAD, y éste igual (McBean et al., 1988) o más potente (Hardebo et al., 1987; Edvinsson y Fredholm, 1983) que la adenosina. A su vez, la adenosina es más potente que D- y L-PIA (Edvinsson y Fredholm, 1983; Hardebo et al., 1987; McBean et al., 1988).

La relajación producida por los agonistas purinérgicos se bloquea parcialmente por metilxantinas tales como teofilina (Hardebo y Edvinsson, 1979), aminofilina (Toda, 1974; Hardebo y Edvinsson, 1979), 1-metil-3-isobutil xantina (MIX) (Salaíces et al., 1985) y 8-fenilteofilina (Edvinsson y Fredholm, 1983; Hardebo et al., 1987). No obstante, esto sólo es cierto para las dosis bajas de agonistas, ya que, a partir de  $3 \times 10^{-6}$  M ó  $3 \times 10^{-5}$  M, el efecto relajante de los agonistas no se modifica significativamente en presencia de las metilxantinas (Toda, 1974; Hardebo y Edvinsson, 1979; Hardebo et al., 1987). Evidencias experimentales obtenidas recientemente indican que el antagonista de los receptores  $P_1$ , 8-fenilteofilina, no desplaza a la derecha las curvas dosis-respuesta de adenosina, 2-ClAD y  $N^6$ -ciclohexil adenosina (CHA) (McBean et al., 1988).

En contraste con las investigaciones acerca de los efectos de los derivados de la adenosina, las que han tenido por objeto analizar los efectos de los derivados del ATP son realmente escasas. De hecho, sólo puede mencionarse el trabajo de Hardebo y colaboradores (1987), en el que se pone de manifiesto que ATP, ADP y los análogos lentamente degradables del ATP,  $\alpha, \beta$ - y  $\beta, \gamma$ -metilén ATP, producen relajación de las arterias cerebrales aisladas, apareciendo una contracción inicial transitoria antes de producirse la relajación.

El efecto contráctil del ATP resulta atenuado después de la taquifilaxia al  $\alpha,\beta$ -metilén ATP inducida por 4-5 aplicaciones del análogo.

Por otra parte, también son escasos los experimentos realizados "in situ" e "in vivo" para la identificación de los receptores que median el efecto de los agonistas purinérgicos, a pesar de que el efecto de la adenosina y sus nucleótidos sobre el flujo sanguíneo cerebral está bien documentado. En este sentido, cabe mencionar el trabajo de Wahl y Kuschinsky (1976), en el cual se demuestra que el aumento dosis-dependiente del calibre de las arterias piales en respuesta a la administración perivascular de adenosina, es bloqueado competitivamente por la teofilina.

Cabe concluir de lo expuesto que la evaluación de la hipótesis purinérgica en la regulación de la circulación cerebral se ha limitado prácticamente a la identificación de receptores  $P_1$  en estudios "in vitro". Es patente la escasez de estudios "in vivo" en los que se identifique el tipo de receptor que media la vasodilatación cerebral inducida por la adenosina y sus nucleótidos, y en los que además se aporte alguna indicación acerca de su significado funcional. Tampoco existen referencias acerca de la posible relación agonistas  $P_2$ /prostaglandinas en la circulación cerebral, ni están caracterizadas las acciones farmacológicas del derivado  $\alpha,\beta$ -metilén ATP, aun cuando actualmente la taquifilaxia a este compuesto es el método más empleado para identificar las respuestas de tipo  $P_2$ . La influencia purinérgica en la regulación de la circulación cerebral es pues un tema no suficientemente conocido que requiere mayor investigación. La presente Tesis Doctoral se ha diseñado con el fin de contribuir al conocimiento de dicha influencia, para lo cual se propone cubrir los objetivos que a continuación se detallan:

## **2.- OBJETIVOS**

El objetivo genérico de la presente Tesis Doctoral consiste en identificar farmacológicamente los tipos de receptores purinérgicos presentes en el lecho vascular cerebral, y establecer el significado funcional de los mismos en la regulación del flujo sanguíneo cerebral. Para ello se empleará una doble metodología:

- a) Estudios "in vivo": registro del flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros hemodinámicos y metabólicos de la cabra sin anestésiar.
- b) Estudios "in vitro": registro de la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales de cabra aisladas.

El plan de trabajo experimental contemplará los siguientes apartados:

- 1.- Estudios con agonistas: obtención de las curvas dosis-respuesta de los agonistas purinérgicos naturales (adenosina, AMP, ADP y ATP) y sintéticos (2-ClAD, NECA, L- y D-PIA y  $\alpha,\beta$ -metilén ATP).
- 2.- Estudios con antagonistas:
  - 2.1.- Receptores  $P_1$ : efecto de los agonistas naturales, adenosina, AMP, ADP y ATP, durante el tratamiento con los antagonistas de los receptores  $P_1$ , teofilina y 8-fenilteofilina.
  - 2.2.- Receptores  $P_2$ : efecto de ATP y su análogo estable,  $\alpha,\beta$ -metilén ATP, durante los siguientes tratamientos: fentolamina, cocaína, metisergida, nicardipina, indometacina y "desensibilización de los receptores  $P_2$  con  $\alpha,\beta$ -metilén ATP".

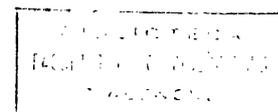
### **3.- MATERIAL Y METODOS**

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

#### 3.1.1.- 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 (Anderson y Jewell, 1956; Baldwin y Bell, 1963), 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 (Reimann et al., 1972) (Figura 4).

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 merced a 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 buccinadora 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 (Daniel et al., 1953; Reimann et al., 1972).

Aunque anatómicamente la rete representa un alto grado de comunicación entre ambos hemisferios, en condiciones normales, sin embargo, la sangre de la rete de un lado no pasa a la del 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 (Reimann et al., 1972).

### 3.1.2.- 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 objetivo la eliminación del flujo sanguíneo que, circulando por la arteria maxilar interna, va a irrigar tejidos extracerebrales. Cuando esto se consigue, el flujo sanguíneo en la arteria maxilar interna coincide con el flujo sanguíneo del correspondiente hemisferio cerebral, y por tanto un transductor electromagnético de flujo implantado en dicha arteria mide en realidad el flujo sanguíneo del hemisferio cerebral ipsilateral (Reimann et al., 1972) (Figura 4).

Todas las intervenciones se realizan en condiciones estériles y con el animal en ayunas. Previa sedación con Ketolar (clorhidrato de ketamina, Parke Davis) a dosis de 10 mg/kg intramuscular, se canaliza la vena safena y se induce

la anestesia administrando lentamente una solución de tiopental sódico al 2% (Pentotal sódico, Abbot). Tras la intubación traqueal y gástrica se mantiene la ventilación asistida con un respirador (ATM, Logic 03A) que suministra una mezcla de halotano (Fluothane, ICI) al 1.5% en oxígeno. Los parámetros ventilatorios son: frecuencia respiratoria 12-14 ciclos/min, volumen ventilatorio 5-7 litros/min y presión de insuflación 20-30 cm H<sub>2</sub>O.

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 buccinadora, 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 a través de la arteria anastomótica procedente de la rete. Dado que por su localización anatómica estas arterias no pueden ser expuestas quirúrgicamente, se inyectan 1000 unidades N.I.H. (National Institute of Health) de trombina (Topostasine, Roche) 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 secundaria. No obstante, la

circulación colateral parece ser suficiente para evitar la necrosis de las partes blandas de la cara. El flujo sanguíneo extracerebral eliminado representa el 30-50% del flujo sanguíneo total que pasa por la arteria maxilar interna (Reimann et al., 1972). En estas condiciones, prácticamente todo el flujo sanguíneo de la arteria maxilar interna es destinado al cerebro, tal y como ha sido confirmado inyectando microesferas marcadas en esta arteria y analizando posteriormente la distribución de la radiactividad en los tejidos extracerebrales e intracerebrales: cuando el método se sigue tal y como se ha descrito, la radiactividad se acumula (aproximadamente el 87%) en el hemisferio ipsilateral, y sólo una pequeña porción de la misma está presente en el hemisferio contralateral (cerca del 11%) y en los tejidos extracerebrales (menos del 3%) (Miletich et al., 1975). Si se tiene en cuenta que el flujo sanguíneo extracerebral representa el 23% del flujo sanguíneo total tras la ligadura de la arteria maxilar interna (Edelman et al., 1972), la importancia de la trombosis de los vasos extracerebrales resulta evidente.

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 hay que constatar que el vaso sanguíneo es normal, a continuación dejar la superficie exterior del vaso limpia y uniforme, y por último asegurarse de que el vaso está ajustado al transductor en todo momento (Wyatt, 1984). Algunos estudios en los que se ha empleado una preparación similar han mostrado una gran correlación entre el flujo sanguíneo cerebral registrado por el método de la fluximetría electromagnética y mediante la técnica de las microesferas radiactivas (Chapman et al., 1979).

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. La inyección o infusión de fármacos directamente en la circulación cerebral se realiza a través de un catéter introducido en la arteria temporal.

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. Como medida preventiva, después de la intervención se inyectan 1.200.000 unidades de penicilina por vía intramuscular.

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.

### 3.1.3.- Técnicas de registro y medición.

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 (Hewlett-Packard 8802A). La presión arterial sistémica se registró 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 registró 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 de 8 canales (Hewlett-Packard 7758A). Durante los experimentos se tomaron muestras de sangre arterial para la determinación de pH,  $pCO_2$  y  $pO_2$  en un analizador de gases (ABL 2, Radiometer).

El flujo sanguíneo cerebral basal se obtiene midiendo la altura en milímetros desde la línea que aparece al practicar una oclusión de la arteria carótida externa (3-4 segundos de duración) y que corresponde al flujo cero, hasta la fase de la onda correspondiente a la sístole cardíaca. El producto de esta distancia por el factor de calibración determinado de antemano, da el flujo sanguíneo cerebral en ml/min. Esta maniobra se repite cuando la inyección de una dosis de un fármaco desarrolla su efecto máximo vasodilatador o vasoconstrictor. La variación de flujo entre ambas situaciones se expresa porcentualmente y en valores absolutos (ml/min). De forma similar se procede para la medición de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, aunque en estos casos el valor cero se obtiene al principio del experimento a partir de la señal interna de los amplificadores correspondientes y se considera constante a lo largo de todo el experimento. La resistencia vascular cerebral se calcula como el cociente entre la presión arterial sistémica en mm Hg, y el flujo sanguíneo cerebral en ml/min por 100 g de tejido, y sus variaciones se expresan porcentualmente. Los valores de pH,  $PaCO_2$  y  $PaO_2$  se leen directamente en el analizador de gases en sus respectivas unidades.

### 3.1.4.- Fármacos y soluciones.

Los fármacos empleados han sido:

adenosina..... (Sigma)  
monofosfato de adenosina (AMP)..... (sal sódica, Sigma)  
difosfato de adenosina (ADP)..... "  
trifosfato de adenosina (ATP)..... (sal disódica, Sigma)  
2-cloroadenosina (2-ClAD)..... (Sigma)  
5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA)..... (RBI)  
L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA)..... "  
D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA)..... "  
 $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta$ -mATP)..... (Sigma)  
acetilcolina (Ach)..... (clorhidrato, Sigma)  
histamina..... (diclorhidrato, Sigma)  
teofilina..... (Sigma)  
8-fenilteofilina..... "  
indometacina..... "  
atropina..... (sulfato, Sigma)  
propranolol..... (Sumial, ICI Farma)  
fentolamina..... (Regitine, Ciba)  
cocaína..... (clorhidrato, Abelló)  
nicardipina..... (Ferrer)  
metisergida..... (Sandoz)

Las soluciones stock de los agonistas, adenosina, AMP, ADP, ATP, 2-ClAD,  $\alpha,\beta$ -mATP, Ach e histamina se prepararon disolviendo la sustancia pura en agua destilada hasta una concentración de 1 mg/ml. La solución stock del derivado NECA se preparó disolviendo la sustancia pura en etanol absoluto hasta una concentración de 10 mg/ml, y las de L- y D-PIA disolviendo la sustancia pura en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración de 10 mg/ml. Todas las concentraciones de uso se obtuvieron diluyendo el correspondiente stock en solución salina fisiológica, de tal forma que todas las dosis fueran administradas en un volumen de 1 ml. La inyección de estos fármacos fue seguida inmediatamen-

te de una inyección de solución salina fisiológica para arrastrar los restos del fármaco que hubieran podido quedar en el catéter temporal.

La solución stock de teofilina se preparó disolviendo la sustancia pura en agua destilada hasta una concentración de 10 mg/ml, obteniéndose las concentraciones de uso con diluciones posteriores del stock en solución salina fisiológica de forma que todas las dosis se infundieran a una velocidad de 1 ml/min, para lo cual se utilizó una bomba de infusión Hoechst PP50. La 8-fenilteofilina se preparó disolviendo la sustancia pura en NaOH 0.2N caliente hasta una concentración de 10 mg/ml, y la concentración de uso (50 µg/ml) mediante dilución posterior en una solución fisiológica de la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 25, y glucosa 5.6. Este antagonista se infundió a una tasa de 2 ml/min.

Las soluciones de propranolol, atropina, fentolamina y cocaína se obtuvieron inmediatamente antes de su uso disolviendo la sustancia pura o el preparado comercial en solución salina fisiológica hasta una concentración de 1 mg/ml. Las soluciones stock de nicardipina y metisergida se obtuvieron disolviendo la sustancia pura en agua destilada hasta una concentración de 1 mg/ml. La concentración de uso se preparó en ambos casos diluyendo el stock en solución salina fisiológica de forma que la dosis se infundiera a una tasa de 1 ml/min. La indometacina se preparó inmediatamente antes de su uso disolviendo la sustancia pura en alcohol absoluto hasta una concentración de 10 mg/ml y a continuación en la solución fisiológica antes mencionada (pH 7.3-7.4) hasta una concentración de 2 mg/ml.

### 3.1.5.- Procedimiento experimental.

Los experimentos se realizan 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. Dicha plataforma va provista de una plancha de metacrilato que se adapta a modo de yugo alrededor del cuello del animal, impidiéndole el movimiento hacia adelante y hacia atrás.

En la mayoría de los casos los experimentos se inician al tercer o cuarto día tras la operación. Una vez situado el animal en la plataforma comienza la experimentación. Aunque lo habitual es que permanezca tranquilo y no manifieste ningún signo de incomodidad durante las inyecciones de fármacos y durante las oclusiones de la arteria carótida, el experimento se interrumpe siempre que aparecen signos de excitación o de irritabilidad, devolviéndose a los estabularios y dejando transcurrir 24 h antes de intentar un nuevo experimento.

Para la obtención de las curvas dosis-respuesta se realizan 3-4 inyecciones de cada una de las dosis seleccionadas, empezando por la más baja (1 µg), y dejando transcurrir un intervalo entre cada inyección suficiente para que se recuperen las condiciones basales. En los experimentos con antagonistas se procede de modo similar, pero repitiendo la curva dosis-respuesta (o las dosis individuales, si es el caso) durante el tratamiento que se esté investigando.

### 3.1.6.- Protocolo experimental.

#### 3.1.6.1.- Curvas dosis-respuesta.

Las sustancias empleadas como agonistas purinérgicos han sido: adenosina, AMP, ADP, ATP, 2-ClAD, NECA, L- y D-PIA y  $\alpha, \beta$ -mATP. El efecto de estos agonistas sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia vascular cerebral, pH, PaCO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub>, se registró inyectando dosis crecientes de los mismos (1,3,10,30 y 100

µg) directamente en la arteria maxilar interna de la cabra sin anestesiar. Con los resultados obtenidos se construyeron las curvas dosis-respuesta de los agonistas purinérgicos sobre el flujo sanguíneo cerebral.

### 3.1.6.2.- Receptores $P_1$ .

Para la identificación de los receptores purinérgicos  $P_1$  se registró el efecto de la adenosina (3, 10 y 30 µg) sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión continua intraarterial (100 y 1000 µg/min) de los fármacos antagonistas de dichos receptores, teofilina y 8-fenilteofilina. Previamente se estableció la selectividad de este último antagonista por los receptores de la adenosina analizando los efectos de otros vasodilatadores tales como Ach e histamina (10 µg) sobre el flujo sanguíneo cerebral, en situación control y durante la infusión continua de 100 µg/min de 8-fenilteofilina.

Con el fin de investigar la posible participación de los receptores vegetativos que median vasodilatación en el lecho vascular cerebral, en el efecto de la adenosina, se registró el efecto del nucleósido (30 µg) sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y después del bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con 1-2 mg de propranolol, y de los receptores colinérgicos muscarínicos con 1-2 mg de atropina, ambos inyectados lentamente en la arteria maxilar interna. Estudios previos han demostrado que estos tratamientos inhiben significativamente los efectos vasodilatadores de isoproterenol y acetilcolina, respectivamente, en el mismo modelo experimental (Lluch et al., 1973; Alborch, 1981).

Para investigar la posible interacción de los nucleótidos de la adenosina con los receptores  $P_1$ , se registró el efecto de AMP, ADP (30 µg) y ATP (10 µg) sobre el flujo

sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión continua intraarterial de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina.

### 3.1.6.3.- Receptores $P_2$ .

En este apartado se han utilizado como agonistas de los receptores  $P_2$  el nucleótido ATP y su análogo estable,  $\alpha,\beta$ -mATP. Como ya se ha mencionado, no existen antagonistas específicos de las respuestas  $P_2$ . En este trabajo se ha adoptado, por su sencillez y su creciente aceptación, el método de la "desensibilización de los receptores  $P_2$  con  $\alpha,\beta$ -mATP", cuyo fundamento se describe con detalle en el modelo experimental "in vitro". Por principio, este método es útil para el bloqueo de las respuestas desencadenadas por el ATP cuando ambos agonistas (ATP y  $\alpha,\beta$ -mATP) tienen el mismo efecto (excitador o inhibidor). Ahora bien, en nuestros experimentos "in vivo" la administración del análogo provoca una respuesta de naturaleza opuesta a la de ATP, es decir, induciendo una prominente vasoconstricción cerebral, y por tanto la aplicación de la técnica no es procedente. Por este motivo, en este apartado se ha investigado la posible relación agonistas  $P_2$ /prostaglandinas y el mecanismo de acción de  $\alpha,\beta$ -mATP.

La posible relación entre la activación de los receptores  $P_2$  y la síntesis de prostaglandinas se investigó registrando los efectos de ATP (10  $\mu\text{g}$ ) y  $\alpha,\beta$ -mATP (100  $\mu\text{g}$ ) sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante el tratamiento de los animales con el inhibidor de la síntesis de prostaglandinas indometacina (5 mg/kg, intraperitoneal). Este tratamiento inhibe el 80% de la síntesis de prostaglandinas en el cerebro y en los vasos sanguíneos de rata (Abdel-Halim et al., 1978). Además, en nuestros experimentos se ha comprobado que la indometacina, administrada de este modo, es capaz de inhibir la respuesta cerebrovascular a la administración en la arteria maxilar interna de una dosis de 50  $\mu\text{g}$  de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ .

Para determinar la posible participación de receptores que median vasoconstricción cerebral en la cabra sin anestesiar, en el efecto de  $\alpha,\beta$ -mATP, se registró su efecto (100  $\mu\text{g}$ ) sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante los siguientes tratamientos: bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos con 1-2 mg de fentolamina, bloqueo de la bomba neuronal con 1-2 mg de cocaína (Lluch et al., 1975) y bloqueo de los receptores triptaminérgicos con metisergida (100  $\mu\text{g}/\text{min}$ ) (Diéguez et al., 1981), todos ellos infundidos lentamente a través del catéter temporal. La posibilidad de que dicho efecto contráctil sea un fenómeno calcio-dependiente se investigó registrando el efecto de  $\alpha,\beta$ -mATP sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión continua intraarterial (100  $\mu\text{g}/\text{min}$ ) del fármaco bloqueante de la entrada de calcio, nicardipina.

### 3.1.7.- Análisis de los resultados.

Cada experimento se repite 2-3 veces en diferentes días en una misma cabra, y al final los resultados se promedian, obteniéndose un solo dato para cada una de las dosis. En los experimentos con antagonistas se obtienen dos datos para cada dosis: uno correspondiente al efecto control (antes del tratamiento), y otro correspondiente al efecto experimental (durante el tratamiento). Con los datos obtenidos en todas las cabras se calcula la media, la desviación típica y el error estándar de la media.

#### *3.1.7.1.- Procedimientos estadísticos.*

El orden de potencia entre agonistas se ha determinado de la siguiente forma:

a) Transformación semilogarítmica (en el eje de abcisas figuran los logaritmos de las dosis) de las curvas dosis-respuesta. Dado que el test de alineación aplicado a todas las dosis investigadas demostró que únicamente la función de

ATP puede considerarse estadísticamente lineal, para la comparación se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g}$  (logaritmo=1 y 2, respectivamente) de cada uno de los agonistas, ya que de este modo todas las funciones son lineales.

b) Ajuste de rectas de regresión a las funciones dosis-respuesta.

c) Análisis de la covarianza (ANCOVA) para las pendientes e intersecciones en el origen de las diferentes rectas de regresión. Revela la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas dentro de cada uno de estos grupos de datos.

d) Test de rango múltiple de Newman-Keuls. Se aplica tanto a pendientes como a intersecciones en el origen, siempre y cuando el ANCOVA correspondiente resulte significativo.

Cuando el ANCOVA resulta "no significativo" para las pendientes (las rectas son paralelas entre sí), y "significativo" para las intersecciones en el origen, el test de Newman-Keuls aplicado a dichas intersecciones en el origen revela el orden de potencia entre las diferentes funciones. Además, en este caso es posible calcular la potencia relativa del siguiente modo: en primer lugar se calcula la pendiente común, la cual se aplica a las funciones semilogarítmicas. La distancia entre las funciones resultantes constituye la potencia relativa entre ellas.

Todos estos métodos han sido descritos con detalle anteriormente (Zar, 1974; Kenakin, 1987; Tallarida y Murray, 1987).

Para la comparación entre los datos "controles" y "experimentales" obtenidos en los experimentos con antagonistas se ha empleado el test de "t" de Student para muestras pareadas, admitiendo un nivel de significación del 5%.

### 3.2.- MODELO EXPERIMENTAL "IN VITRO": REGISTRO DE LA TENSION ISOMETRICA DESARROLLADA POR ARTERIAS CEREBRALES AISLADAS.

#### 3.2.1.- Preparación experimental.

Los experimentos se realizan 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 sacrifica inyectando en la vena yugular 10-15 ml de una solución de KCl saturada. El cráneo se expone mediante una incisión circular a nivel de la base del cuerno, realizándose la craniectomía con una sierra eléctrica siguiendo dicha incisión. Una vez descubierto el encéfalo, el cerebro se separa del resto del eje nervioso tras haber retirado la duramadre y seccionado las vías aferentes y eferentes nerviosas y hemáticas. Inmediatamente se sumerge en solución salina fisiológica fría (0-4°C) y se procede a la disección de las arterias cerebrales. Las dos arterias cerebrales medias se disecan bajo lupa binocular (WILD, Heerbrugg) a 6.4 aumentos y se cortan en segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud.

El registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos de arterias cerebrales se realiza siguiendo el método descrito por Nielsen y Owman (1971) (Figura 5). 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 a su vez se ajusta a la pared del baño y que mantiene al cilindro arterial en posición horizontal, mientras que el otro, en forma de ángulo recto con lados de desigual longitud, 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 de arriba a abajo en sentido perpendicular al eje mayor del segmento vascular en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la

pared arterial. El tiempo total empleado en el montaje de la preparación es de unos 30 minutos.

El baño de órganos consta de cuatro cubetas capaces de alojar un segmento vascular cada una, que contienen 5 ml de solución Ringer-Locke (NaCl 120 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.2 mM, MgCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.0 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM y glucosa 5.6 mM) burbujeada continuamente con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub> (95%) y CO<sub>2</sub> (5%), lo 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°C. Además se dispone de un recipiente que contiene la solución de Ringer-Locke en condiciones idénticas a las descritas, y que se utiliza para renovar el medio en el que se hallan inmersas las arterias.

### 3.2.2.- Técnicas de registro y medición.

El sistema de registro consta, para cada segmento arterial, de un transductor de tensión "Universal Transducing Cell" UC3 (Gould Statham), una microescala accesoria UL5 (Gould Statham), un tornillo micrométrico "Micrometer Boss Head" (Bioscience) adaptado al transductor capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre móvil, y un amplificador de tensión Hewlett-Packard 8805C. La tensión se registra continuamente en dos registradores (Omniscribe, Houston, mod. D 5237-5) de dos canales cada uno.

Los cambios de tensión isométrica producidos por fármacos que incrementan la tensión vascular se cuantifican midiendo sobre el trazado la longitud desde la línea basal de tensión hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las dosis. Esta distancia se multiplica por el factor de calibración determinado de antemano, lo cual permite la conversión de unidades de longitud (mm) en unidades de tensión (mg). Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentual-

mente respecto del efecto máximo obtenido al final de la curva dosis-respuesta.

Los cambios de tensión isométrica producidos por fármacos que reducen la tensión vascular se cuantifican de forma similar, pero considerando como línea basal la que se obtiene cuando una dosis de un agente vasoconstrictor alcanza un efecto (tono activo) que se mantiene estable durante el tiempo suficiente para obtener la curva dosis-respuesta. Las cantidades obtenidas tras la conversión se expresan siempre porcentualmente respecto de dicho tono activo.

### 3.2.3.- Fármacos y soluciones.

Los fármacos empleados en este apartado coinciden en su mayor parte con los utilizados en los estudios "in vivo". De la relación anterior se han excluido los siguientes: acetilcolina, histamina, teofilina, atropina y propranolol. Como agentes inductores de la tensión activa se ha utilizado indistintamente 5-hidroxitriptamina (complejo sulfato-creatinina, Sigma) o prostaglandina F<sub>2α</sub> (sal Tris, Sigma).

Para la preparación de las correspondientes soluciones stock se han utilizado los disolventes ya mencionados, obteniéndose una concentración de almacenamiento de 10<sup>-2</sup>M.

### 3.2.4.- Procedimiento experimental.

Mediante la rotación del tornillo micrométrico se aplica 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 hasta que se alcance el equilibrio, lo cual sucede entre los 60 y los 90 minutos desde el momento del primer ajuste. Durante este período el líquido nutritivo se renueva cada 15 minutos aproximadamente.

Una vez se ha alcanzado la tensión basal constante de 1 g, se obtienen las curvas dosis-respuesta acumulativamente: la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis es la resultante de la suma de ésta 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 algún agente vasoconstrictor capaz de mantener la tensión el tiempo suficiente para realizar la curva dosis-respuesta. El volumen total de un fármaco añadido al baño no supera en ningún caso el 10% del volumen del líquido del baño. Después de cada curva se renueva repetidamente la solución nutritiva, dejando transcurrir 45-60 minutos antes de realizar una nueva curva dosis-respuesta.

Los experimentos con antagonistas se llevan a cabo obteniendo una primera curva dosis-respuesta para el agonista que se está investigando. A continuación se lava repetidamente la preparación hasta que se recupera la línea de tensión basal, momento en el cual se añade el fármaco antagonista cuyo efecto se pretende estudiar. Después de un período de 10-15 minutos de incubación, y sin lavar, se obtiene la segunda curva dosis-respuesta para el agonista. En los experimentos de relajación, la incubación con el antagonista se inicia cuando se ha alcanzado el tono activo.

### 3.2.5.- Protocolo experimental

#### 3.2.5.1.- Curvas dosis-respuesta.

Los fármacos empleados como agonistas purinérgicos han sido: adenosina, AMP, ADP, ATP, 2-ClAD, NECA, L- y D-PIA y  $\alpha, \beta$ -mATP. El efecto de estos agonistas sobre la tensión isométrica se registró obteniendo las curvas dosis-respuesta en un rango de dosis desde  $10^{-9}$  a  $10^{-4}M$ , aunque en algunos

casos estos márgenes fueron más estrechos. Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron tanto en segmentos sometidos a la tensión basal de 1 g, como en segmentos sometidos a tono activo inducido por una dosis única de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}M$ ) ó 5-hidroxitriptamina ( $3 \times 10^{-7}M$ ).

#### 3.2.5.2.- Receptores $P_1$ .

Para la identificación de los receptores  $P_1$  se registró el efecto de adenosina y ATP ( $10^{-8}$ - $10^{-4}M$ ) en segmentos arteriales precontraídos, en situación control y durante la incubación con 8-fenilteofilina. Previamente se obtuvo la curva dosis-respuesta para este antagonista, ya que a dosis superiores a  $10^{-6}M$  exhibió un claro efecto relajante. En los experimentos con adenosina se utilizó la dosis más alta de 8-fenilteofilina que no tuvo efecto relajante per se, la cual resultó ser, según los casos,  $3 \times 10^{-7}$  ó  $10^{-6}M$ .

#### 3.2.5.3.- Receptores $P_2$ .

Como agonistas de los receptores  $P_2$  se han utilizado el nucleótido ATP y su análogo estable,  $\alpha, \beta$ -mATP. Dado que en segmentos sin tono activo ambos agonistas tuvieron el mismo efecto, en este caso sí pudo aplicarse el método de la "desensibilización de los receptores  $P_2$  con  $\alpha, \beta$ -mATP". La técnica consiste en administrar una dosis de  $\alpha, \beta$ -mATP ( $10^{-5}M$ ) repetidamente hasta que no se obtiene ningún efecto (taquifilaxia completa), momento en el cual se obtiene la curva dosis-respuesta de ATP. El efecto contráctil de ambos agonistas se investigó además durante los siguientes tratamientos: fentolamina ( $10^{-6}M$ ), cocaína ( $10^{-6}M$ ), metisergida ( $10^{-4}M$ ), nicardipina ( $10^{-7}$ - $10^{-5}M$ ) e indometacina ( $10^{-5}M$ ).

El efecto relajante de ATP en segmentos arteriales sometidos a tono activo se investigó durante el tratamiento con indometacina ( $10^{-7}$ - $10^{-6}M$ ).

### 3.2.6.- Análisis de los resultados.

En cada segmento arterial se realizan varias curvas dosis-respuesta en un mismo día. Los resultados se agrupan posteriormente por experimentos, y a partir de los datos obtenidos en todos los segmentos se calcula la media aritmética, la desviación típica y el error estándar de la media para cada una de las dosis. Con estos resultados se construyen las curvas dosis-respuesta de los diferentes fármacos.

En cada curva dosis-respuesta se calcula la dosis ED<sub>50</sub>, es decir, aquella concentración del fármaco que produce la mitad del efecto máximo. Para ello se halla la mitad del efecto máximo y las concentraciones que lo acotan. A continuación se calcula la concentración que corresponde a la mitad del efecto máximo mediante una proporción entre el efecto y el logaritmo de la concentración. Para calcular el valor medio de la ED<sub>50</sub> y su intervalo de confianza, se calcula la media y el intervalo de confianza de los (-)logaritmos de las ED<sub>50</sub> (pD<sub>2</sub>), ya que dichos logaritmos se ajustan a una distribución normal. La posterior conversión aplicando antilogaritmos proporciona la media geométrica y sus intervalos de confianza.

#### *3.2.6.1.- Procedimientos estadísticos.*

El orden de potencia entre agonistas se establece aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) tanto a los valores de pD<sub>2</sub>, como a los efectos máximos alcanzados en cada una de las correspondientes curvas dosis-respuesta. Cuando el ANOVA resulta "significativo" se aplica el test de rango múltiple de Newman-Keuls.

Para la comparación entre los valores de pD<sub>2</sub> y efecto máximo correspondientes a las curvas dosis-respuesta "con-

troles" y "experimentales", se ha empleado el test de "t" de Student para muestras pareadas, admitiendo un nivel de significación del 5%.

## 4.- RESULTADOS

4.1.- Efecto de los agonistas purinérgicos sobre el flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros hemodinámicos y metabólicos de la cabra sin anestésiar.

4.1.1.- Derivados naturales de la adenosina: AMP, ADP y ATP.

La inyección de dosis crecientes (1,3,10,30 y 100  $\mu$ g) de adenosina en la arteria maxilar interna de la cabra sin anestésiar produjo incremento del flujo sanguíneo cerebral. Este efecto vasodilatador empieza a ponerse de manifiesto prácticamente en el momento en el que finaliza la inyección, alcanzando su valor máximo en unos pocos segundos y desapareciendo progresivamente en un tiempo similar. En la Figura 6 se presenta un registro obtenido en el transcurso de uno de los experimentos con adenosina en el que puede constatar-se esta evidencia experimental. Como puede apreciarse sobre dicho registro, los aumentos de flujo sanguíneo cerebral no se acompañan de cambios apreciables en el resto de parámetros hemodinámicos monitorizados simultáneamente: presión arterial y frecuencia cardíaca, por lo que puede afirmarse que los incrementos de flujo sanguíneo cerebral producidos por la adenosina resultan de las reducciones de la resistencia vascular cerebral.

El análisis gasométrico de las muestras de sangre arterial obtenidas antes y durante la vasodilatación cerebral inducida por la adenosina no mostró diferencias significativas en los valores de pH,  $pCO_2$  y  $pO_2$ . En la Tabla II se cuantifica el efecto de una dosis de adenosina sobre todos los parámetros investigados: únicamente los valores de flujo sanguíneo y de resistencia vascular cerebrales muestran diferencias significativas entre la situación control (antes de la inyección) y durante el efecto originado por la dosis administrada.

Posiblemente, la principal característica de la respuesta vascular cerebral a la adenosina es la de dosis-dependencia: los incrementos de flujo sanguíneo cerebral son mayores a medida que se incrementa la dosis. En virtud de esta característica es posible representar la función dosis-respuesta de la adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral, la cual aparece en la Figura 7. Los valores de flujo sanguíneo cerebral, expresados como incrementos porcentuales respecto de los valores controles, se representan en función de las dosis administradas, sobre un trazado decimal.

Los derivados nucleotídicos de la adenosina, AMP, ADP y ATP, inyectados por la misma vía y en un rango de dosis idéntico al de la adenosina, provocaron una respuesta de la circulación cerebral de las mismas características que las descritas para el nucleósido: incrementos del flujo sanguíneo cerebral de magnitud dosis-dependiente, que no se acompañan de cambios en parámetros sistémicos. Las curvas dosis-respuesta de los tres derivados nucleotídicos se incluyen en la Figura 7.

Uno de los objetivos propuestos en este punto fue el de establecer el orden de potencia y, si procedía, la potencia relativa entre los cuatro agonistas. El procedimiento que se sigue habitualmente es el de transformar las funciones dosis-respuesta sobre una base semilogarítmica, lo cual suele proporcionar funciones a las que es posible ajustar rectas de regresión. El posterior análisis de la covarianza para pendientes e intersecciones en el origen revela las posibles diferencias entre las funciones comparadas. Aunque este fue el procedimiento seguido, las rectas de regresión no pudieron ajustarse a todas las dosis que conforman la función dosis-respuesta, ya que el test de alineación sólo resultó ser no significativo (es decir, la función puede considerarse estadísticamente lineal) para el ATP. En consecuencia, se optó por ajustar las rectas de regresión a los resultados obtenidos con dos de las dosis investigadas: 10 y

100 µg. Las funciones obtenidas para cada uno de los agonistas se presentan en la Figura 8. El análisis de la covarianza demuestra que las pendientes de las cuatro funciones no difieren significativamente entre sí, lo cual permite determinar la pendiente común, la cual toma el valor de 40.0. Las funciones transformadas se recogen en la Tabla III.

Por otra parte, el análisis de la covarianza para intersecciones en el origen demuestra la existencia de diferencias significativas entre las cuatro funciones. El test de rango múltiple de Newman-Keuls revela cuáles son las diferencias entre los grupos comparados. En la Tabla IV aparecen los resultados de ambos análisis con el orden obtenido. Dado que las cuatro funciones son paralelas, el orden de potencia entre los agonistas queda determinado por las intersecciones en el origen, resultando ser por tanto el que aparece en la Tabla: ATP>adenosina=ADP=AMP. También es posible calcular la potencia relativa entre los cuatro agonistas, ya que, por ser las funciones paralelas, esta proporción se mantiene constante en cualquier intervalo. Los valores correspondientes se muestran en la Tabla V. Como puede observarse, el efecto del ATP es aproximadamente tres veces el de la adenosina, cuatro veces el de ADP, y cinco veces el de AMP, siendo estas proporciones significativas.

4.1.2.- Derivados sintéticos de la adenosina: 2-cloroadenosina (2-ClAD), 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA), D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA) y  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta$ -mATP).

La inyección de dosis crecientes (1,3,10,30 y 100 µg) del derivado 2-ClAD directamente en la circulación cerebral de la cabra sin anestesiar causó incrementos del flujo sanguíneo cerebral de magnitud dosis-dependiente que no se acompañaron de cambios significativos en el resto de parámetros hemodinámicos y metabólicos registrados. La respuesta

de la circulación cerebral a este agonista exhibió una característica diferencial respecto a la desencadenada por la adenosina: mientras que los incrementos de flujo sanguíneo cerebral provocados por el nucleósido son de corta duración en todo el rango de dosis investigado, la vasodilatación producida por el derivado 2-cloro permanece durante varios minutos, sobre todo a las dosis de 30 y 100  $\mu\text{g}$ . En esta fase la frecuencia cardíaca resulta ligeramente incrementada, no apreciándose cambios en la presión arterial. A la dosis más alta las condiciones basales suelen recuperarse transcurridos 10-15 minutos.

Por su parte, el derivado L-PIA produjo una respuesta del flujo sanguíneo cerebral de características semejantes a la adenosina: incrementos dosis-dependientes transitorios, sin cambios concomitantes en los demás parámetros. No sucedió lo mismo con el derivado D-PIA, cuya administración no dió lugar a cambios significativos del flujo sanguíneo cerebral en ninguna de las dosis investigadas (1,3,10,30 y 100  $\mu\text{g}$ ). En la Figura 9 se exponen las curvas dosis-respuesta obtenidas en todos los experimentos con 2-ClAD y L-PIA. Como punto de referencia para poder estimar fácilmente la diferencia entre los efectos de ambos agonistas y la adenosina, se ha incluido la curva dosis-respuesta de esta última.

La inyección de NECA en la arteria maxilar interna de la cabra sin anestesiar dió origen a una respuesta similar a la de 2-ClAD, aunque en este caso se manifestaron efectos sistémicos secundarios de gran magnitud, sobre todo a la dosis más elevada (100  $\mu\text{g}$ ). Inmediatamente tras la inyección del fármaco se registra el incremento del flujo sanguíneo cerebral. Unos pocos segundos después de alcanzarse el efecto máximo se produce una caída de flujo sanguíneo cerebral, cuyo origen reside en el descenso brusco de la presión arterial, ya que ambos fenómenos se producen concomitantemente. Como respuesta compensatoria aparece una taquicardia reactiva de larga duración, fase durante la cual también se

mantiene incrementada la presión arterial diferencial. Ambos factores son posiblemente los responsables de la elevada magnitud a la que se mantiene el flujo sanguíneo cerebral. Estos efectos sistémicos se aprecian más claramente cuando el fármaco se administra por vía intravenosa (Figura 10).

La cuantificación de los efectos de la inyección intraarterial de NECA (100  $\mu$ g) se recoge en la Tabla VI. Con el término "Respuesta I" se recogen los valores de flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral en el momento en el que el incremento de flujo sanguíneo cerebral es máximo. Durante esta fase, las variaciones más acusadas corresponden al flujo sanguíneo cerebral, el cual aumenta en un 87%, y a la resistencia vascular cerebral, la cual se reduce en un 50%. Con el término "Respuesta II" se recogen los valores de los parámetros mencionados, registrados en la fase de taquicardia reactiva. En dicho período, el parámetro que experimenta la mayor variación respecto de la Respuesta I es la frecuencia cardíaca, cuyo incremento es superior al 35%.

Debido a la larga duración de la fase de taquicardia reactiva que aparece tras la administración de dosis de NECA superiores a 10  $\mu$ g, la curva dosis-respuesta para este fármaco no pudo obtenerse según el procedimiento habitual. Por ello sólo se inyectaron las dosis de 10 y 100  $\mu$ g con un intervalo de al menos 30 minutos entre ambas. Los resultados obtenidos se utilizaron posteriormente para establecer el orden de potencia de los agonistas purinérgicos sintéticos que producen vasodilatación cerebral: 2-ClAD, NECA y L-PIA. En la Figura 11 se presentan las rectas de regresión ajustadas a los resultados obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu$ g de los mencionados agonistas. Por su interés se ha incluido igualmente la de la adenosina.

Los análisis de la covarianza y de Newman-Keuls para pendientes e intersecciones en el origen, así como el orden

establecido entre los cuatro agonistas en cada caso, se recogen en las Tablas VII y VIII, respectivamente. Como puede comprobarse, la adenosina y su derivado 2-ClAD comparten la misma pendiente, siendo ésta superior a la de los otros dos derivados, NECA y L-PIA. A su vez, la de NECA es superior a la de L-PIA. Por lo que respecta a las intersecciones en el origen, existe una gradación bien determinada entre los cuatro agonistas: 2-ClAD>NECA>L-PIA>adenosina. Debido a que las pendientes de 2-ClAD y adenosina no son estadísticamente diferentes entre sí, pero sí sus intersecciones en el origen, es posible calcular la pendiente común y la potencia relativa entre ambos agonistas, la cual resulta ser de 4.36 en favor del derivado 2-cloro. A pesar de que las conclusiones de los análisis mencionados no son estrictamente idénticas, sí es posible extraer una conclusión común: los derivados 2-ClAD y NECA exhiben un mayor poder vasodilatador cerebral "in vivo" que el derivado L-PIA.

La inyección de dosis crecientes (1,3,10,30 y 100 µg) de  $\alpha,\beta$ -mATP directamente en la circulación cerebral de la cabra sin anestésiar tuvo un efecto opuesto a la del resto de agonistas investigados, es decir, redujo el flujo sanguíneo cerebral. En la Figura 12 se muestra el registro obtenido en el transcurso de uno de los experimentos con  $\alpha,\beta$ -mATP. Como puede apreciarse, la presión arterial y la frecuencia cardíaca no se modifican durante la fase de reducción del flujo sanguíneo cerebral. No obstante, y dado que el efecto vasoconstrictor cerebral del fármaco permanece durante algún tiempo, en la fase de estabilización puede presentarse, sobre todo a la dosis más alta (100 µg), un ligero incremento de la presión arterial y un ligero descenso de la frecuencia cardíaca, repercusiones de los efectos sistémicos del fármaco. En la Tabla IX se recogen los valores de flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral, obtenidos con la dosis de 100 µg de  $\alpha,\beta$ -mATP. Dichos valores corres-

ponden a la medición en el mismo instante en el que el flujo sanguíneo cerebral alcanza su valor mínimo. Efectivamente, en este momento la vasoconstricción cerebral no se asocia con cambios significativos de presión arterial ni de frecuencia cardíaca, lo cual demuestra que dicha reducción se debe al incremento de la resistencia vascular cerebral. Para la dosis de 100  $\mu\text{g}$ , este incremento alcanza prácticamente el 90%. La curva dosis-respuesta de  $\alpha, \beta$ -mATP sobre el flujo sanguíneo cerebral se presenta en la Figura 13, en la que las reducciones del flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores controles. En la misma Figura se ha incluido también la curva de ATP con el fin de que los efectos de ambos agonistas, estructuralmente muy próximos, sean fácilmente comparables.

#### 4.2.- Efecto de los agonistas purinérgicos sobre la tensión isométrica desarrollada por arterias cerebrales de cabra aisladas.

##### 4.2.1.- Derivados naturales de la adenosina: AMP, ADP y ATP.

La respuesta de las arterias cerebrales aisladas a los agonistas purinérgicos dependió fundamentalmente de la existencia previa de un tono activo inducido farmacológicamente. Cuando no se suministró dicho tono, es decir, cuando las arterias estuvieron sometidas únicamente a la tensión pasiva por estiramiento de 1 g, la exposición a dosis crecientes ( $10^{-8}$ - $10^{-4}\text{M}$ ) de adenosina y AMP no produjo cambios apreciables de la tensión vascular. Los nucleótidos ADP y ATP, por el contrario, desencadenaron una respuesta contráctil que empezó a manifestarse a dosis superiores a  $10^{-5}\text{M}$ . A partir de la mencionada concentración, los incrementos de tensión exhibieron una clara dosis-dependencia, siendo mayores a medida que se elevó la dosis. La Figura 14 recoge la respuesta contráctil al ATP de un segmento arterial desprovisto de tono activo. La curva dosis-respuesta para este nucleótido

se presenta en la Figura 15, en la que se ha incluido además la obtenida con otro de los agonistas que produce vasoconstricción en ausencia de tono activo previo:  $\alpha, \beta$ -mATP.

La exposición de las arterias cerebrales aisladas a una dosis única de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}M$ ) ó 5-hidroxitriptamina ( $3 \times 10^{-7}M$ ) originó incremento de la tensión vascular. Cuando este incremento se mantuvo a un nivel constante (tono activo), se procedió a la adición de dosis crecientes ( $10^{-8}$ - $10^{-4}M$ ) de los agonistas purinérgicos. En estas condiciones, los cuatro agonistas provocaron la pérdida del tono activo, es decir, produjeron relajación. No obstante, el patrón de relajación no fue de las mismas características entre los agonistas, distinguiéndose, por un lado, la respuesta a adenosina y AMP, y por otra, a ADP y ATP. Las Figuras 16 y 17, consistentes en los registros obtenidos en dos experimentos con adenosina y ATP respectivamente, permiten la comparación entre ambos. Como puede apreciarse, a partir de la dosis de  $10^{-7}M$  aproximadamente, la adenosina comienza a manifestar su efecto relajante; la adición de una nueva dosis desencadena una relajación instantánea a partir de la tensión mantenida por la dosis inmediatamente anterior. Por lo que respecta al ATP, el patrón de relajación es semejante al de adenosina a dosis bajas; sin embargo, la respuesta es más compleja a dosis superiores a  $10^{-5}M$ , ya que antes de la relajación aparece una contracción que resulta rápidamente superada por la acción relajante del fármaco. Esta contracción inicial transitoria adquiere mayor entidad a medida que se va aumentando la dosis, llegando al extremo (frecuentemente a la dosis de  $10^{-4}M$ ) en el que el efecto contráctil prevalece sobre el relajante. En la Figura 18 se recogen las curvas dosis-respuesta de relajación para adenosina y ATP obtenidas a partir de todos los experimentos con ambos agonistas. Como elemento comparativo se ha incluido igualmente la del derivado 2-cloroadenosina. Los valores de relajación se expresan como porcentaje de tensión perdida respecto de la tensión activa previa. A causa del fenómeno que

se acaba de describir, la relajación ocasionada por el ATP declina a la dosis de  $10^{-4}M$ .

Los valores del efecto máximo y de la dosis que produce la mitad de dicho efecto máximo ( $ED_{50}$ ), así como el número de experimentos realizados con cada uno de los cuatro agonistas, aparecen en la Tabla X. Los resultados de los análisis estadísticos pertinentes para establecer el orden de potencia entre los cuatro agonistas se exponen en las Tablas XI y XII. El análisis de la varianza y de Newman-Keuls para los valores de  $ED_{50}$  (Tabla XI) se realizaron utilizando los valores de  $pD_2$  ( $-\log ED_{50}$ ), ya que se ajustan a una distribución normal. El primero de dichos análisis reveló la existencia de diferencias significativas entre los cuatro grupos, mientras que el segundo permitió establecer el orden entre ellos. Dado que el parámetro  $ED_{50}$  proporciona una medida de la afinidad de un agonista por su receptor, puede concluirse que el nucleótido ADP exhibe la mayor afinidad, mientras que la adenosina y el AMP muestran la menor afinidad. Resulta igualmente de interés constatar que el receptor implicado en el efecto relajante de estos agonistas es más afín por el ATP que por la adenosina.

Si el valor de  $ED_{50}$  aporta una estimación de afinidad, el valor del efecto máximo permite evaluar la eficacia de un fármaco. En este sentido, los análisis de la varianza y de Newman-Keuls para todos los valores de efecto máximo de los cuatro agonistas (Tabla XII) permiten afirmar que la eficacia de la adenosina es igual a la de ATP y superior a la de AMP y ADP.

#### 4.2.2.- Derivados sintéticos de la adenosina: 2-ClAD, NECA, L- y D-PIA y $\alpha, \beta$ -mATP.

El hecho de que la adenosina no exhibiera ningún efecto en arterias desprovistas de tono activo nos inclinó a ensa-

yar la respuesta a sus derivados sintéticos únicamente en arterias sometidas a tono activo.

La adición de dosis crecientes ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) de 2-ClAD, NECA, L- y D-PIA produjo relajación dosis-dependiente de los segmentos arteriales precontraídos, sin que se apreciara ningún componente contráctil subsidiario. El patrón de relajación guarda gran semejanza con el obtenido para la adenosina. Las curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de todos los experimentos con estos agonistas se presentan en la Figura 19. Los valores de  $ED_{50}$  y efecto máximo se recogen en la Tabla XIII. Los análisis estadísticos demostraron que el orden de afinidad para estos cuatro agonistas es el siguiente: NECA>2-ClAD>D-PIA=L-PIA (Tabla XIV). Por lo que respecta al efecto máximo, no se detectó ninguna diferencia significativa entre los valores medios de los cuatro grupos comparados (Tabla XV).

La respuesta de las arterias cerebrales al derivado del ATP,  $\alpha,\beta$ -mATP, se obtuvo tanto en arterias desprovistas de tono activo como en arterias sometidas a dicho tono. En el primer caso, la adición de dosis crecientes ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) de  $\alpha,\beta$ -mATP ocasionó una consistente respuesta contráctil. La Figura 20 muestra un registro obtenido durante uno de estos experimentos. A pesar de que este efecto es el mismo que el del ATP, varias son las características que los diferencian: en primer lugar, que el efecto contráctil del  $\alpha,\beta$ -mATP tiene lugar en un rango de dosis inferior al de ATP. Este hecho se refleja lógicamente en los valores de  $ED_{50}$  para cada uno de ellos: mientras que el de  $\alpha,\beta$ -mATP se encuentra alrededor de  $3 \times 10^{-7}$ M, el de ATP está alrededor de  $1-2 \times 10^{-4}$ M (véanse las Tablas XXIII y XXIV), lo cual supone que la afinidad para el  $\alpha,\beta$ -mATP es unas 2000 veces mayor que para el ATP. En segundo lugar, la respuesta al ATP es mucho más rápida que al  $\alpha,\beta$ -mATP. La curva dosis-respuesta para el  $\alpha,\beta$ -mATP obtenida

a partir de todos los experimentos realizados en segmentos arteriales sin tono activo previo, se recoge en la Figura 15.

El derivado  $\alpha, \beta$ -mATP mostró sin duda la mayor coherencia en lo que se refiere a la naturaleza de la respuesta provocada, ya que en arterias sometidas a tono activo continuó desencadenando una clara respuesta contráctil sin que se advirtiera ningún componente relajante. En la Figura 21 se expone un registro obtenido en estas condiciones experimentales. El perfil de la respuesta es prácticamente idéntico al presentado en la Figura anterior, pero partiendo de un nivel basal de tensión superior. La curva dosis-respuesta para este agonista obtenida a partir de todos los experimentos realizados en segmentos arteriales sometidos a tono activo previo se recoge en la Figura 22. Siguiendo el criterio adoptado para la elaboración de la Figura 13, correspondiente al efecto de ambos agonistas "in vivo", también se incluye en la Figura 22 la curva dosis-respuesta para el ATP, con el fin de que los efectos de ambos agonistas sean más fácilmente comparables.

#### 4.3.- Estudios con fármacos antagonistas de los receptores purinérgicos.

##### 4.3.1.- Receptores $P_1$ .

###### 4.3.1.1.- Estudios "in vivo".

El efecto vasodilatador cerebral "in vivo" de la adenosina no se modificó significativamente tras el tratamiento de los animales con el antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos, atropina, y el antagonista  $\beta$ -adrenérgico, propranolol. En la Figura 23 se recogen los resultados obtenidos con la dosis de 30  $\mu$ g de adenosina, administrada antes y durante los mencionados tratamientos.

Uno de los fármacos caracterizado como antagonista selectivo de los receptores  $P_1$  es la teofilina, cuyos efectos "per se" sobre la circulación cerebral, así como sobre el efecto vasodilatador cerebral de la adenosina, han sido objeto de estudio en nuestras investigaciones.

El efecto de la teofilina sobre la circulación cerebral dependió no sólo de la dosis administrada, sino también de la forma de administración. La Figura 24 corresponde a un registro obtenido durante la infusión continua de 2 mg/min del antagonista. Como puede apreciarse, inmediatamente después del comienzo de la infusión el flujo sanguíneo cerebral experimenta un acusado incremento que se mantiene mientras dura la infusión. Ni la presión arterial sistémica ni la frecuencia cardíaca sufren cambios apreciables durante la infusión, lo cual indica que el efecto vasodilatador cerebral de la teofilina se produce como consecuencia de la disminución de la resistencia vascular cerebral. Por el contrario, la infusión continua de 1 mg/min de teofilina no tuvo ningún efecto aparente sobre la circulación cerebral. Cuando la dosis de 1 mg se administró en forma de bolo único, el flujo sanguíneo cerebral experimentó un incremento superior al 40%. El nulo efecto sobre presión arterial sistémica y frecuencia cardíaca determinó una reducción de la resistencia vascular cerebral del 30%. Los valores correspondientes a estos experimentos aparecen en la Tabla XVI.

En cuanto al efecto de teofilina sobre la vasodilatación cerebral producida por adenosina, los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XVII. El antagonista mostró un ligero pero significativo efecto inhibitor durante la infusión de 100  $\mu$ g/min, si bien este hecho sólo se pone de manifiesto cuando la diferencia entre los valores de flujo sanguíneo cerebral controles y tras la inyección de 30  $\mu$ g del agonista se expresa porcentualmente. Por el contrario, cuando la tasa de infusión se incrementó hasta 1 mg/min, el

efecto inhibitor del antagonista quedó patente independientemente de las unidades consideradas para establecer la comparación estadística. En este caso, el efecto de la adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral a la dosis de 30  $\mu\text{g}$  se vió reducido en un 30% en presencia del antagonista.

Otro de los fármacos investigado como antagonista de los receptores,  $P_1$  ha sido el derivado de la teofilina, 8-fenilteofilina, del que se afirma tiene mayor poder inhibitor sobre las respuestas de tipo  $P_1$  que la teofilina.

El efecto de 8-fenilteofilina sobre el flujo sanguíneo cerebral y el resto de parámetros hemodinámicos y metabólicos de la cabra sin anestesiar, queda recogido en la Tabla XVIII. Durante la infusión continua de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina, ninguno de los parámetros registrados experimentó cambios significativos respecto de los correspondientes valores control. Este hecho puede constatarse igualmente en la Figura 25. Efectivamente, ni el registro de flujo sanguíneo cerebral, ni el de presión arterial sistémica ni el de frecuencia cardíaca sufren oscilaciones apreciables durante la infusión de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina.

En este mismo registro queda patente un hecho experimental relevante: la vasodilatación cerebral producida por la adenosina resulta atenuada en presencia del antagonista. La cuantificación completa de los resultados obtenidos, así como su representación gráfica, se muestran en la Figura 26, en la que aparecen los efectos sobre flujo sanguíneo cerebral de las dosis de 3, 10 y 30  $\mu\text{g}$  de adenosina, antes y durante la infusión continua de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina. La comparación estadística entre ambas funciones dosis-respuesta se ha realizado según el procedimiento descrito: transformación semilogarítmica de las funciones, ajuste de las rectas de regresión y análisis de la covarianza para pendientes e intersecciones en el origen. Las rectas

de regresión obtenidas se presentan en la Figura 27. El análisis de la covarianza para pendientes e intersecciones en el origen demuestra que existen diferencias significativas entre ambas funciones, tanto para uno como para otro parámetro, lo cual indica que la 8-fenilteofilina desplaza significativamente a la derecha la curva dosis-respuesta de la adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral.

De particular interés resulta determinar la posible selectividad de 8-fenilteofilina respecto del receptor implicado en el efecto de la adenosina. Para ello se investigó el efecto de otros vasodilatadores de la circulación cerebral, en situación control y en presencia del antagonista. Los fármacos vasodilatadores empleados fueron: acetilcolina (Ach) e histamina. En la Figura 28 se exponen los efectos de la dosis de 10  $\mu\text{g}$  de ambos agonistas sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, antes y durante la infusión continua de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina. Como elemento comparativo se han incluido los resultados obtenidos en los experimentos con la misma dosis de adenosina. Estos resultados demuestran que el efecto vasodilatador cerebral de Ach e histamina no se modifica en presencia de 8-fenilteofilina.

Un estudio semejante al descrito acerca de la capacidad de 8-fenilteofilina para inhibir los efectos de la adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral, se ha llevado a cabo con el resto de agonistas purinérgicos naturales: AMP, ADP y ATP. En la Figura 29 se muestran los efectos de las dosis de 3, 10 y 30  $\mu\text{g}$  de ATP sobre el flujo sanguíneo cerebral, en condiciones control y durante la infusión de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina. Las rectas de regresión ajustadas a la transformación semilogarítmica de ambas funciones quedan reflejadas en la Figura 30. La comparación estadística entre ambas funciones indica que las pendientes no son estadísticamente diferentes entre sí, pero sí las intersecciones en el origen.

El antagonista 8-fenilteofilina se mostró igualmente capaz de atenuar la vasodilatación cerebral producida por los derivados nucleotídicos de la adenosina, AMP y ADP. En la Figura 31 se expresan los efectos de la dosis de 30  $\mu\text{g}$  de ambos agonistas sobre el flujo sanguíneo cerebral, antes y durante la infusión de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina. A modo de estudio comparativo se han incluido los resultados correspondientes a adenosina y ATP, cuyas dosis de 30 y 10  $\mu\text{g}$ , respectivamente, producen un efecto sobre el flujo sanguíneo cerebral próximo al 50%. Estos resultados pueden expresarse igualmente como reducción porcentual respecto del correspondiente valor control. Desde esta perspectiva, el efecto de la adenosina se reduce en  $38.4 \pm 3.2\%$ , el de AMP en un  $35.7 \pm 5.3$ , el de ADP en un  $25.8 \pm 3.3$  y el de ATP en un  $8.8 \pm 2.0\%$ . El análisis de la varianza indica que existen diferencias significativas entre los cuatro grupos de valores. El test de rango múltiple de Newman-Keuls revela el siguiente orden entre los cuatro grupos: adenosina=AMP>ADP>ATP. Es decir, adenosina y AMP exhiben la misma sensibilidad frente a 8-fenilteofilina, siendo ésta superior a la de ADP, la cual a su vez es superior a la de ATP. En definitiva, este último nucleótido muestra la menor sensibilidad al bloqueo con el antagonista selectivo de las respuestas de tipo  $P_1$ , 8-fenilteofilina.

#### 4.3.1.2.-Estudios "in vitro".

La adición al baño de dosis acumulativas ( $10^{-7}$ - $10^{-4}\text{M}$ ) de 8-fenilteofilina, originó una respuesta relajante en arterias cerebrales aisladas sometidas previamente a tono activo. Dicha respuesta comenzó a ponerse de manifiesto entre las dosis de  $3 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}\text{M}$ , alcanzándose una relajación próxima al 80% del tono activo previo con la dosis más alta investigada ( $10^{-4}\text{M}$ ). La curva dosis-respuesta de relajación obtenida a partir de todos los experimentos con 8-fenilteofilina se representa gráficamente en la Figura 32.

La respuesta relajante de las arterias cerebrales aisladas a adenosina y ATP, no se vió alterada significativamente durante la exposición a dosis de 8-fenilteofilina que no tuvieron ningún efecto "per se" sobre la tensión activa ( $3 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}$ M). La Tabla XIX recoge los valores de ED<sub>50</sub> y efecto máximo de adenosina y ATP, en situación control y durante la incubación con 8-fenilteofilina.

#### 4.3.2.- Receptores P<sub>2</sub>.

##### *4.3.2.1.- Estudios "in vivo".*

La administración intraperitoneal de indometacina a dosis de 5 mg/kg produjo cambios significativos en todos los parámetros hemodinámicos registrados en la cabra sin anestesiar. En la Tabla XX se recogen los efectos de este tratamiento sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral. Estas modificaciones pueden apreciarse visualmente en la Figura 33, correspondiente al trazado obtenido en el transcurso de uno de los experimentos con ATP.

Sobre el trazado de la Figura 33 queda plasmada una evidencia experimental: la vasodilatación cerebral inducida por el ATP no resulta alterada durante el tratamiento con indometacina. Ya que el incremento del flujo sanguíneo cerebral inducido por el nucleótido tiene lugar a partir de un nivel basal de flujo de menor magnitud que el correspondiente control, la vasodilatación resulta mayor en términos relativos, aunque no en absolutos. Esto es lo que queda cuantificado en la Tabla XXI, en la que se recogen los efectos de la dosis de 10 µg de ATP, en condiciones control y durante el tratamiento con indometacina.

El efecto vasoconstrictor cerebral "in vivo" de  $\alpha, \beta$ -mATP ha sido investigado durante los siguientes tratamientos: fentolamina, cocaína (1-2 mg, intraarterial), metiser-

gida, nicardipina (100 µg/min, intraarterial) e indometacina (5 mg/kg, vía intraperitoneal). En la Figura 34 se resumen todos los resultados obtenidos al respecto. Obsérvese que únicamente el fármaco bloqueador de la entrada de calcio, nicardipina, se muestra capaz de atenuar la vasoconstricción cerebral originada por la dosis de 100 µg del agonista.

#### 4.3.2.2.- Estudios "in vitro".

Al igual que en los estudios "in vivo", la respuesta relajante ocasionada por ATP en arterias cerebrales aisladas provistas de tono activo se investigó únicamente durante la incubación con indometacina.

La exposición de los segmentos arteriales precontraídos al inhibidor indometacina ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$ M), provocó un incremento mantenido del tono activo de magnitud dependiente de la dosis administrada. Expresados porcentualmente respecto del tono activo previo, estos incrementos de tensión alcanzaron los siguientes valores medios:  $18.7 \pm 5.8\%$  para la dosis de  $10^{-7}$ M y  $50.5 \pm 14.9\%$  para la dosis de  $10^{-6}$ M. En estas condiciones, la adición de dosis acumulativas de ATP ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M) desencadenó una respuesta relajante cuyos parámetros definitorios ( $ED_{50}$  y efecto máximo) no difirieron significativamente de los obtenidos en ausencia del inhibidor. La Figura 35 ilustra ambas evidencias experimentales. Los valores de  $ED_{50}$  y efecto máximo de ATP en situación control y durante la incubación con indometacina se recogen en la Tabla XXII.

La respuesta contráctil al ATP de las arterias cerebrales aisladas sometidas únicamente a la tensión pasiva de 1 g, se investigó durante los siguientes tratamientos: fentolamina, cocaína, indometacina y "desensibilización de los receptores  $P_2$  con  $\alpha, \beta$ -mATP". Como ya se ha comentado, esta técnica consiste en administrar una dosis de  $\alpha, \beta$ -mATP ( $10^{-5}$ M) repetidamente hasta que no se obtiene respuesta

(taquifilaxia completa), momento en el cual se ensaya el efecto del ATP. En nuestros experimentos esto sucede después de 2-3 exposiciones a  $\alpha, \beta$ -mATP.

La Tabla XXIII recoge los resultados correspondientes a todos los tratamientos. Se han incluido igualmente los resultados correspondientes al efecto de una segunda exposición a ATP para demostrar que la respuesta es reproducible en dos ocasiones consecutivas y sin que medie ningún tratamiento entre ellas. Como puede observarse, tanto la incubación con indometacina como la exposición repetida a  $\alpha, \beta$ -mATP desplazan las curvas dosis-respuesta a la derecha (los valores de ED<sub>50</sub> son significativamente mayores) y reducen los valores de efecto máximo. A modo de ejemplo, en la Figura 36 se han representado las curvas dosis-respuesta de ATP en arterias desprovistas de tono activo, en situación control y tras la desensibilización de los receptores P<sub>2</sub> con  $\alpha, \beta$ -mATP.

La respuesta contráctil de las arterias cerebrales aisladas a  $\alpha, \beta$ -mATP se investigó de forma semejante al ATP, pero ampliando el número de tratamientos con el antagonista de los receptores triptaminérgicos, metisergida, y el bloqueador de la entrada de calcio, nicardipina. Como puede constatarse en la Tabla XXIV, únicamente este último fármaco, a la dosis de  $10^{-5}$ M, es capaz de desplazar la curva dosis-respuesta de  $\alpha, \beta$ -mATP a la derecha. La Figura 37 muestra las curvas dosis-respuesta de  $\alpha, \beta$ -mATP en arterias cerebrales desprovistas de tono activo, en situación control y durante la incubación con nicardipina.

## FIGURAS

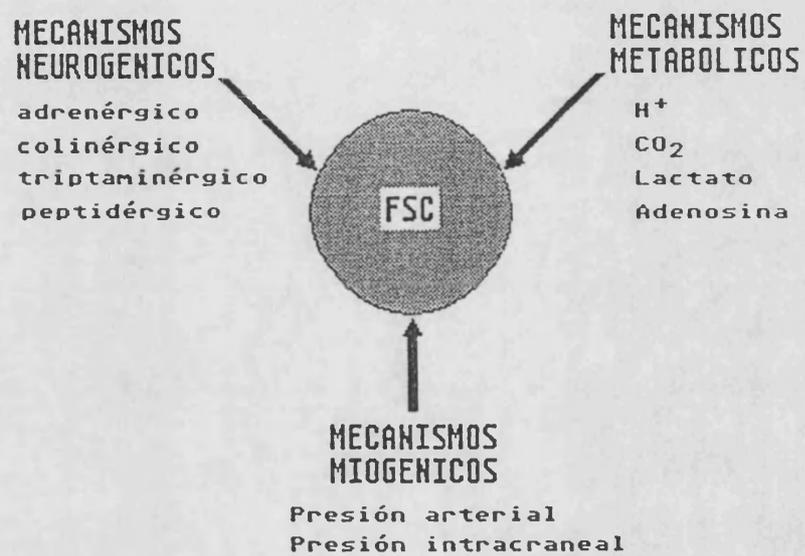


Figura 1.- Factores que intervienen en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (FSC).

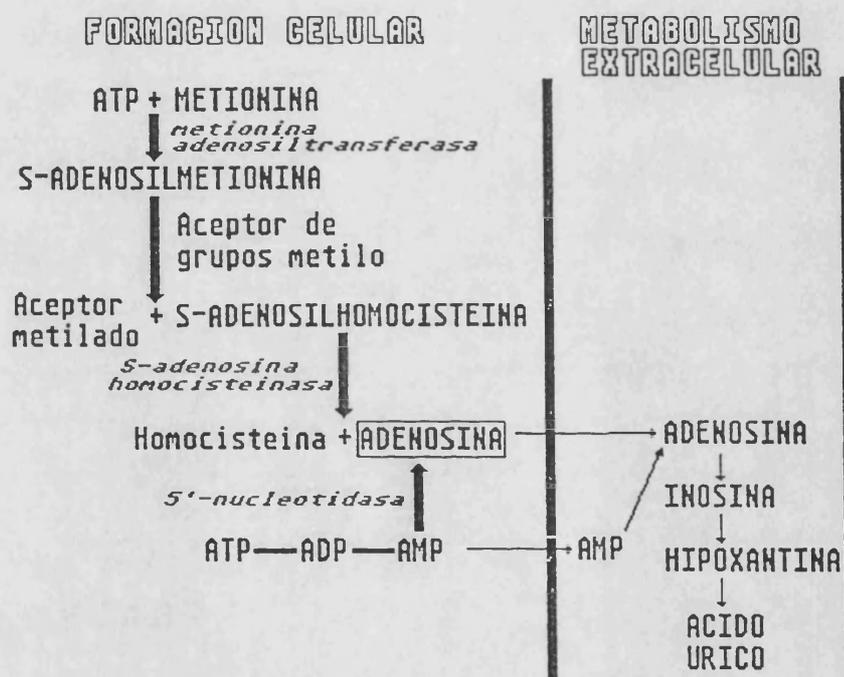


Figura 2.- Representación esquemática de las vías de formación celular y de metabolismo extracelular de adenosina.

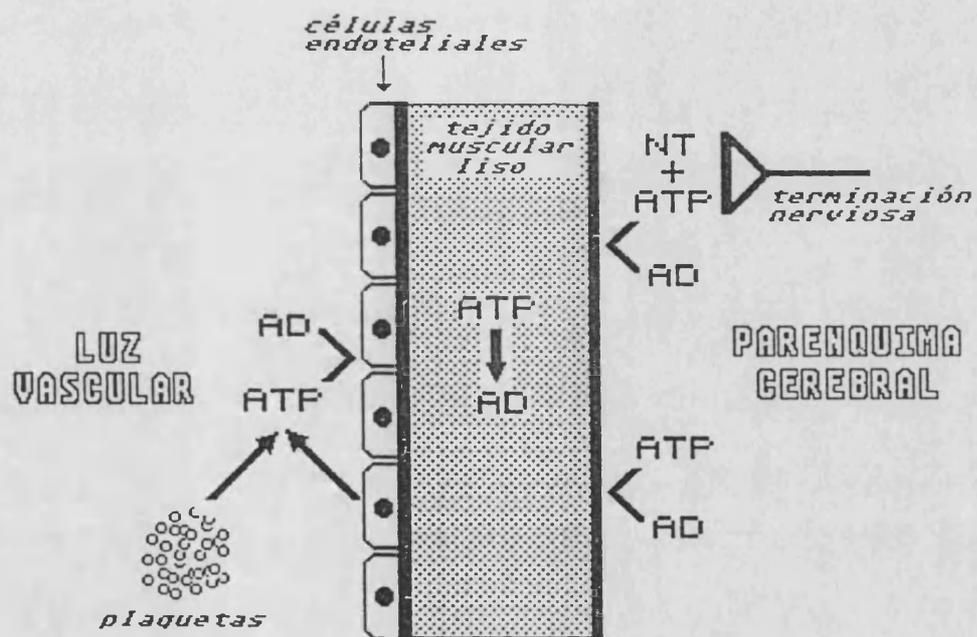


Figura 3.- Representación esquemática de los posibles orígenes del ATP extracelular en el espacio perivascular cerebral. **NT**=neurotransmisor primario.

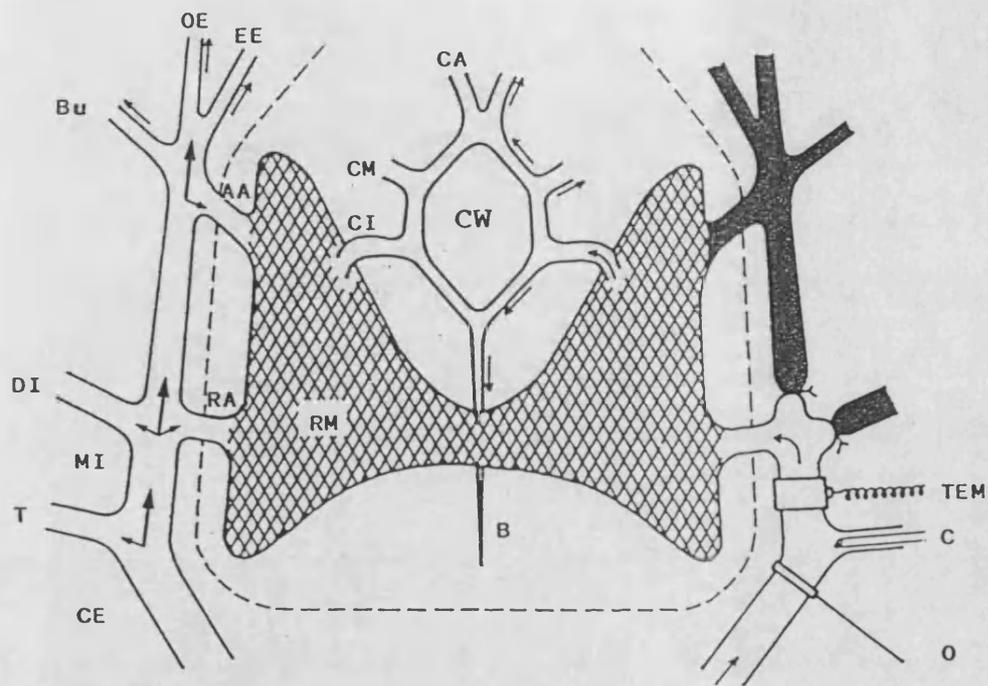


Figura 4.- Esquema de la circulación cerebral de la cabra en condiciones normales (izquierda) y después de la ligadura de las arterias maxilar interna y dental inferior, junto con la inyección de trombina en la arteria maxilar interna (derecha). Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo. **CW**=círculo de Willis; **RM**=rete mirabile; **TEM**=transductor electromagnético de flujo; **C**=catéter; **O**=ocluidor; **RA**=ramo anastomótico; **AA**=arteria anastomótica; **CE**=arteria carótida externa; **CI**=arteria carótida interna; **CM**=arteria cerebral media; **CA**=arteria cerebral anterior; **B**=arteria basilar; **T**=arteria temporal; **DI**=arteria dental inferior; **MI**=arteria maxilar interna; **Bu**=arteria buccinadora; **OE**=arteria oftálmica externa; **EE**=arteria etmoidal externa.

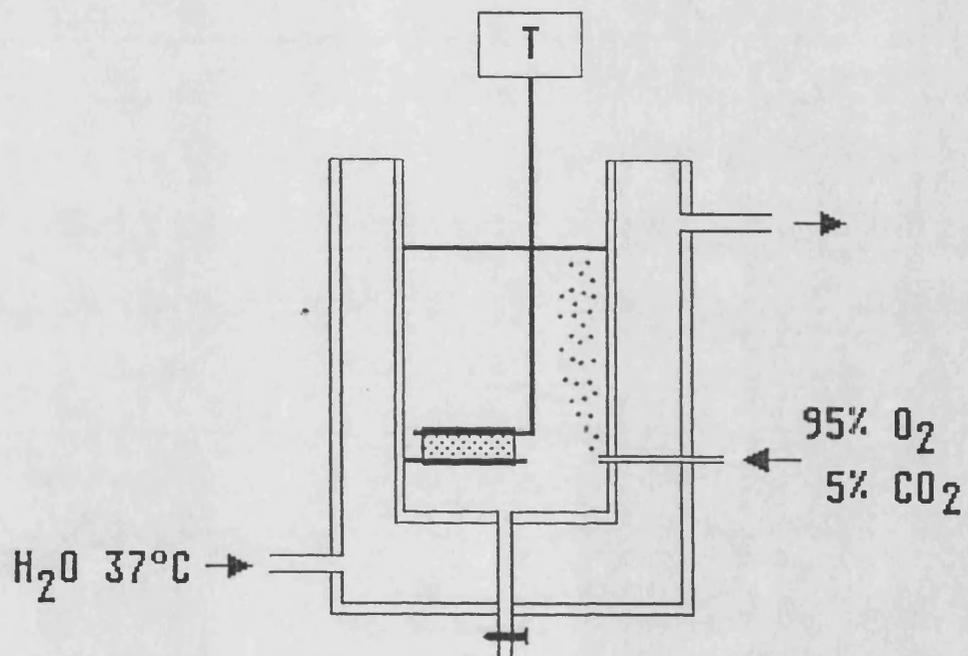


Figura 5.- Esquema de la preparación experimental para el registro de tensión isométrica en segmentos vasculares. T=transductor de tensión isométrica.

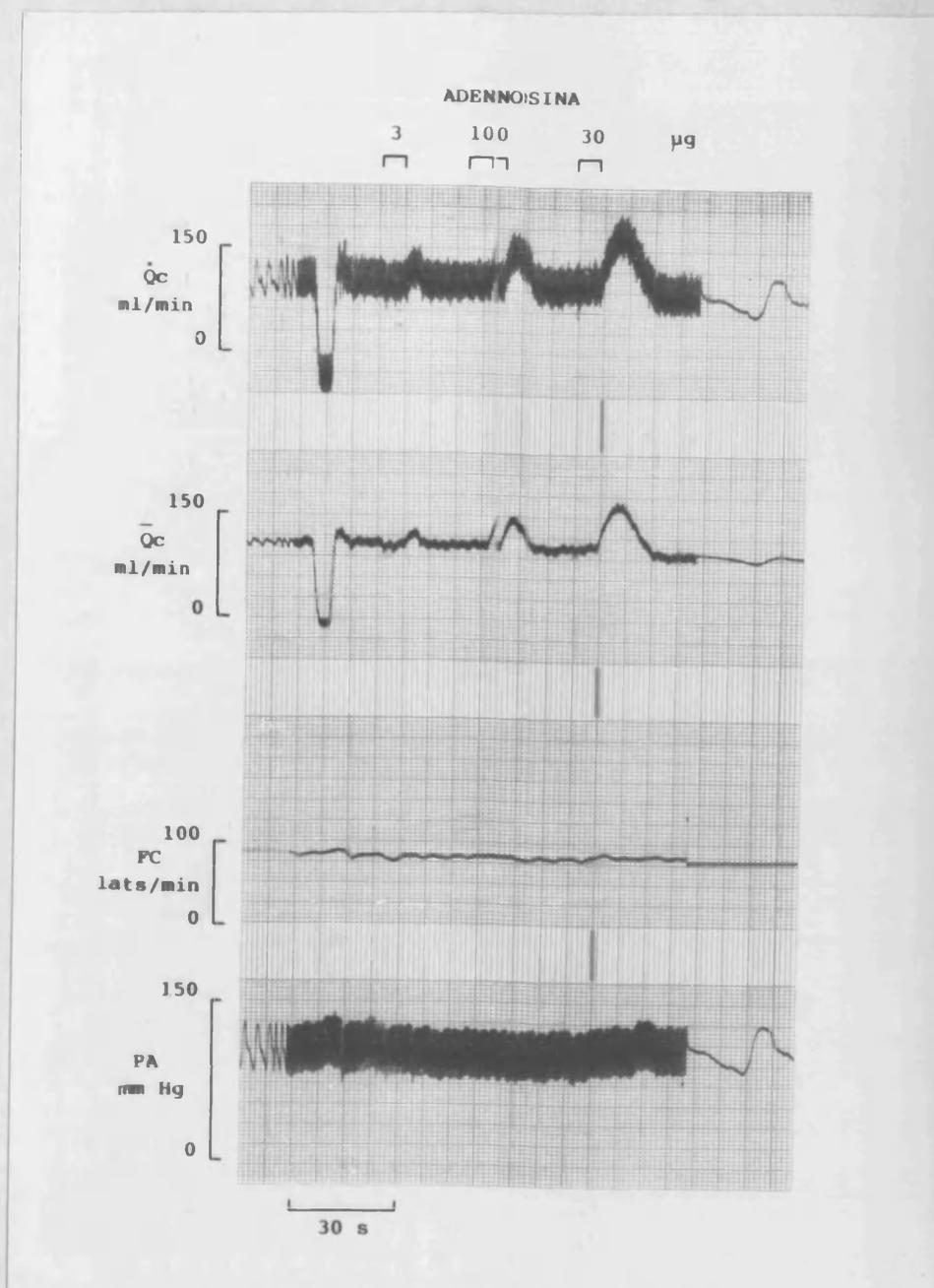


Figura 6.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA), obtenido en una cabra sin anestesiada a la cual se le administraron dosis crecientes de adenosina a través del catéter temporal.

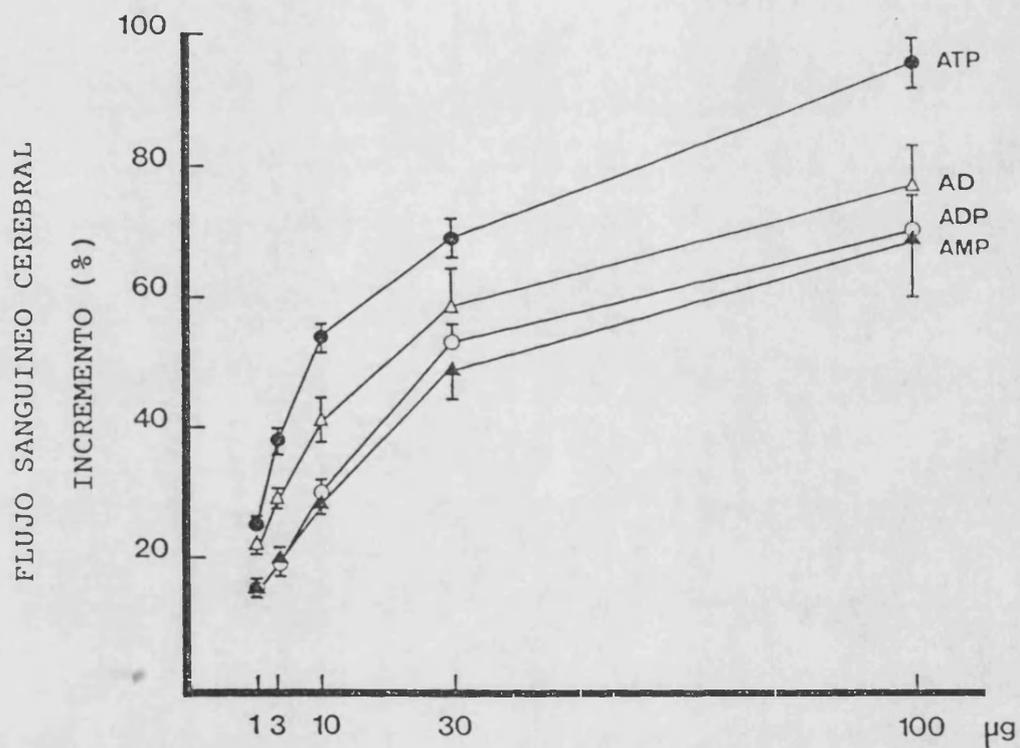


Figura 7.- Efecto de la administración intraarterial de dosis crecientes de adenosina (AD, n=25), AMP (n=14), ADP (n=7) y ATP (n=15), sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse. Los incrementos del flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

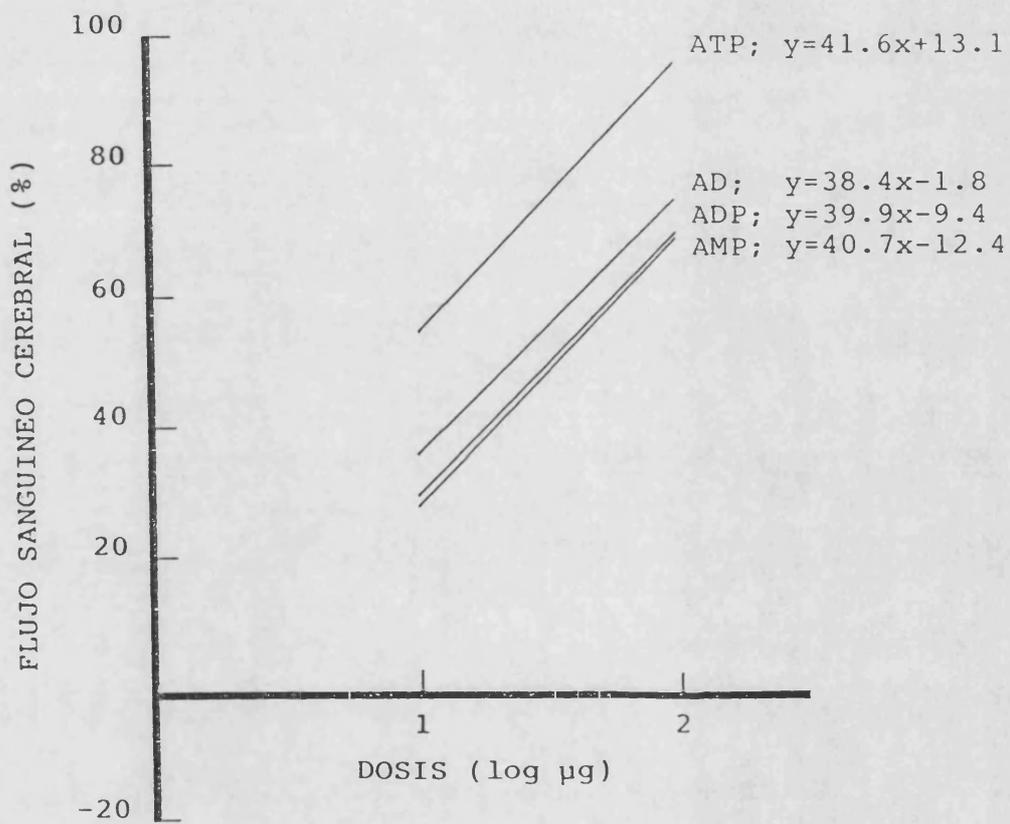


Figura 8.- Ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100 μg de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP.

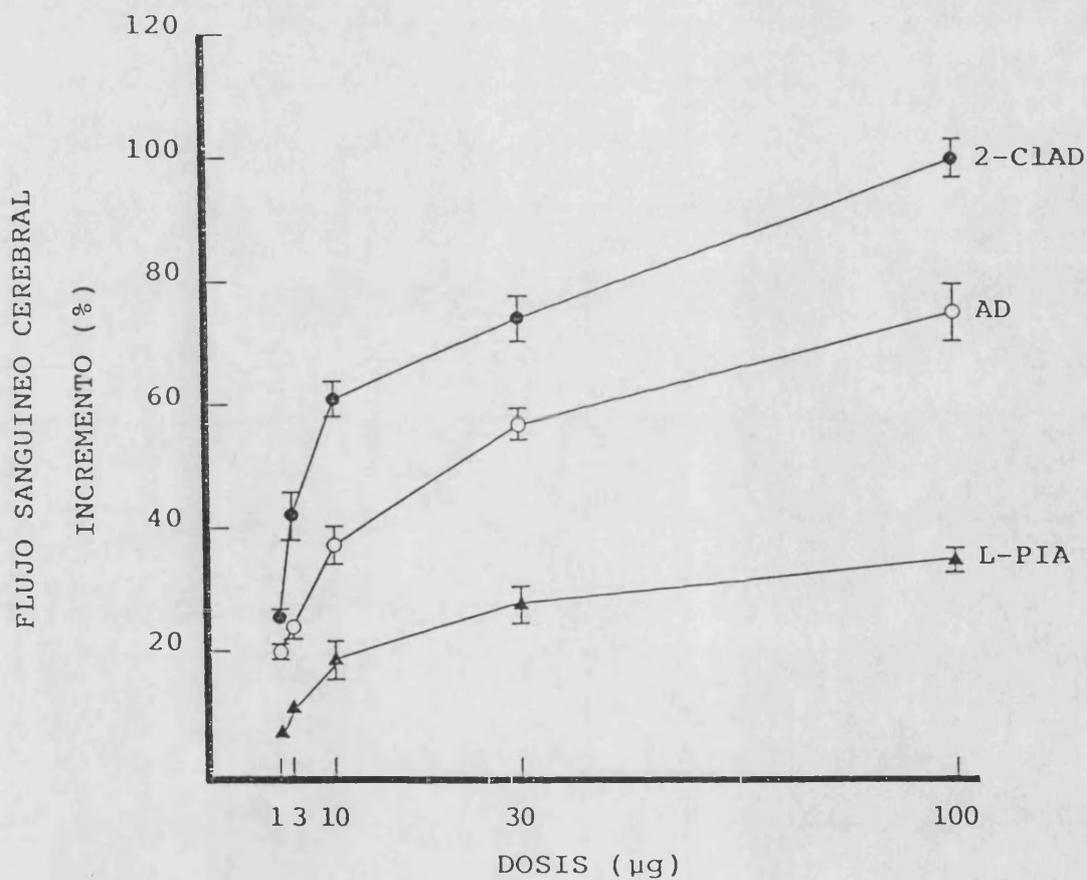


Figura 9.- Efecto de la administración intraarterial de de dosis crecientes de de 2-cloroadenosina (2-ClAD, n=18), adenosina (AD, n=25) y L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA, n=5), sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiado. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

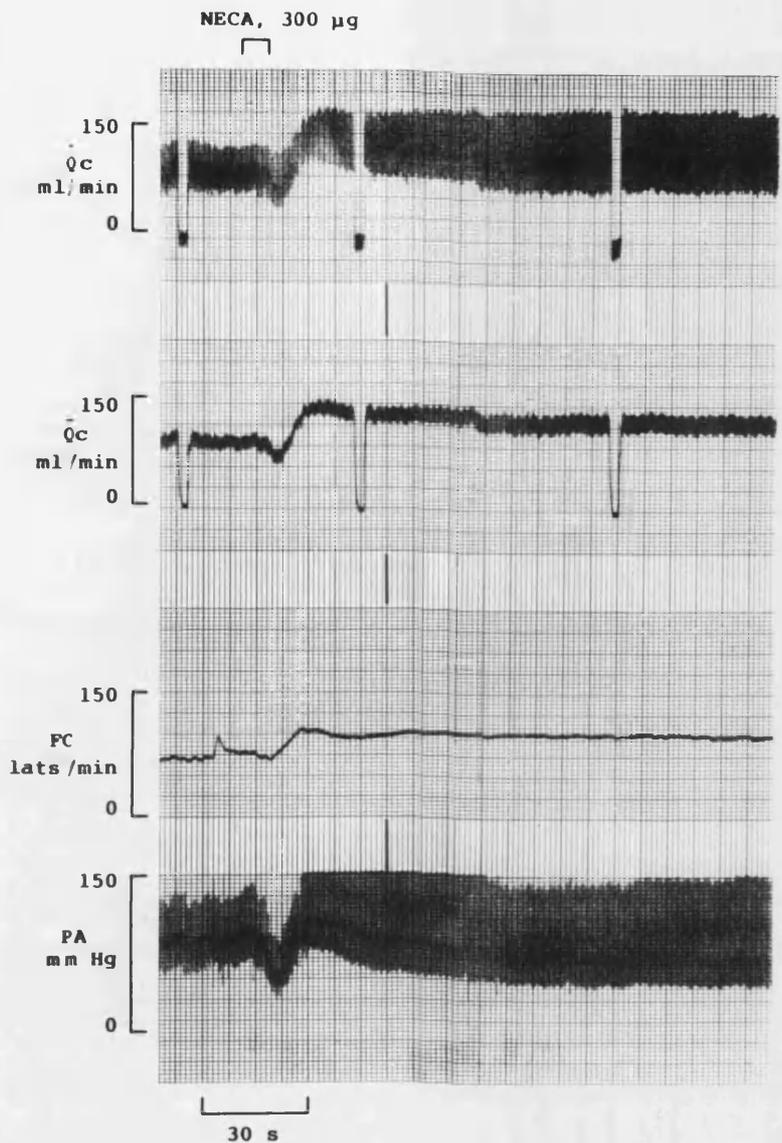


Figura 10.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA), obtenido en una cabra sin anestesiarse a la cual se le administró una dosis de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA) por vía intravenosa (yugular).

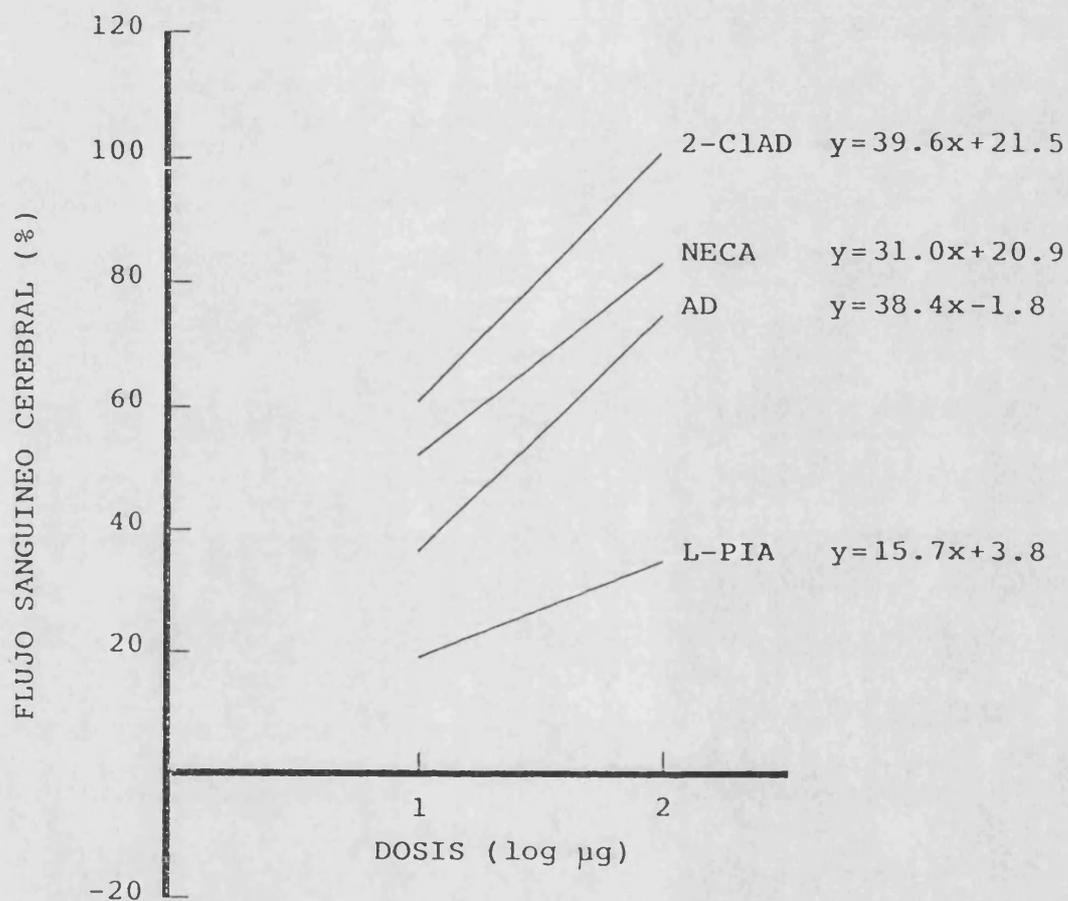


Figura 11.- Ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100 µg de 2-cloroadenosina (2ClAD), 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), adenosina (AD) y L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA).

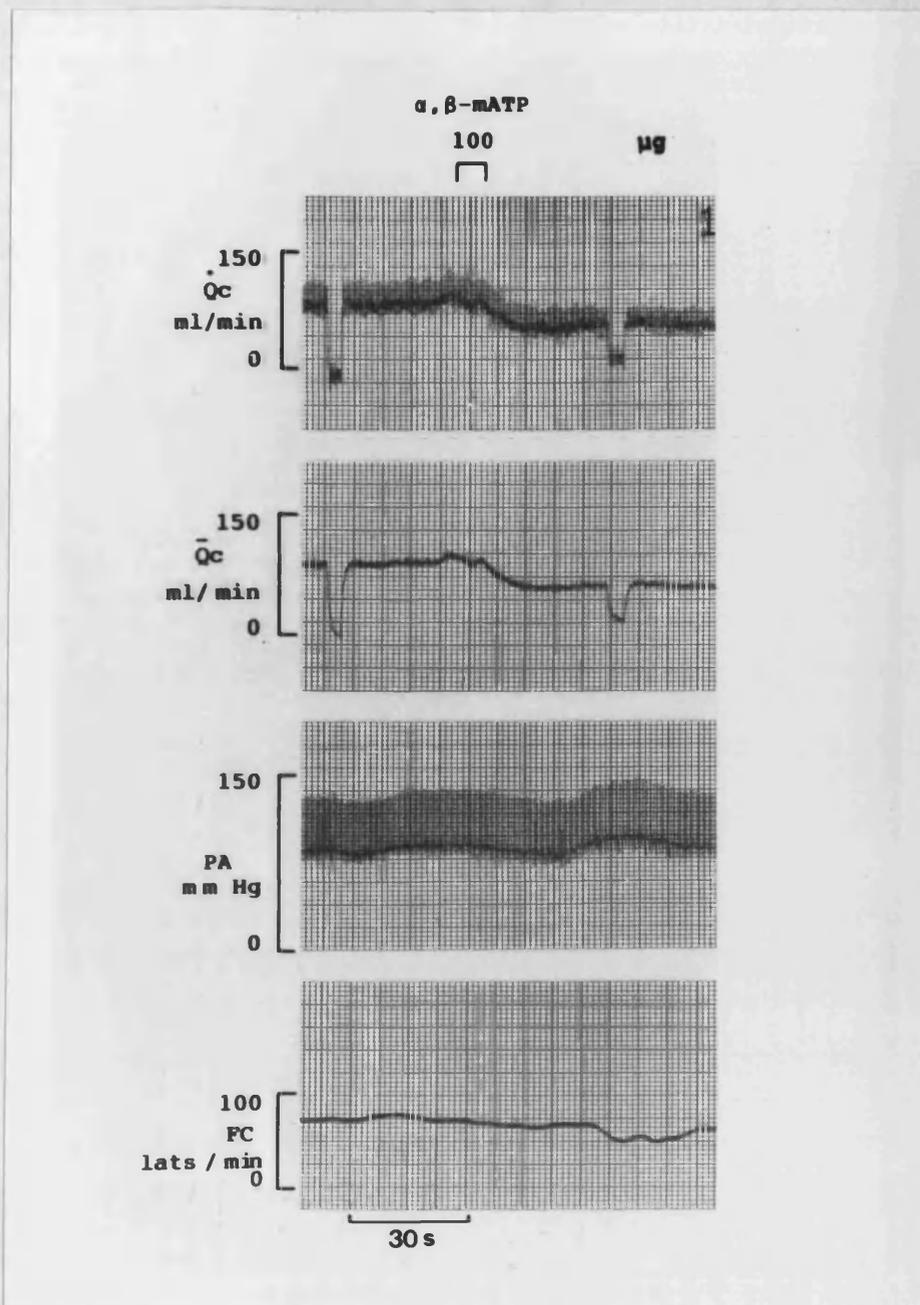


Figura 12.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA), obtenido en una cabra sin anestesiarse a la cual se le administró una dosis de  $\alpha, \beta$ -metilén ATP ( $\alpha, \beta$ -mATP) a través del catéter temporal.

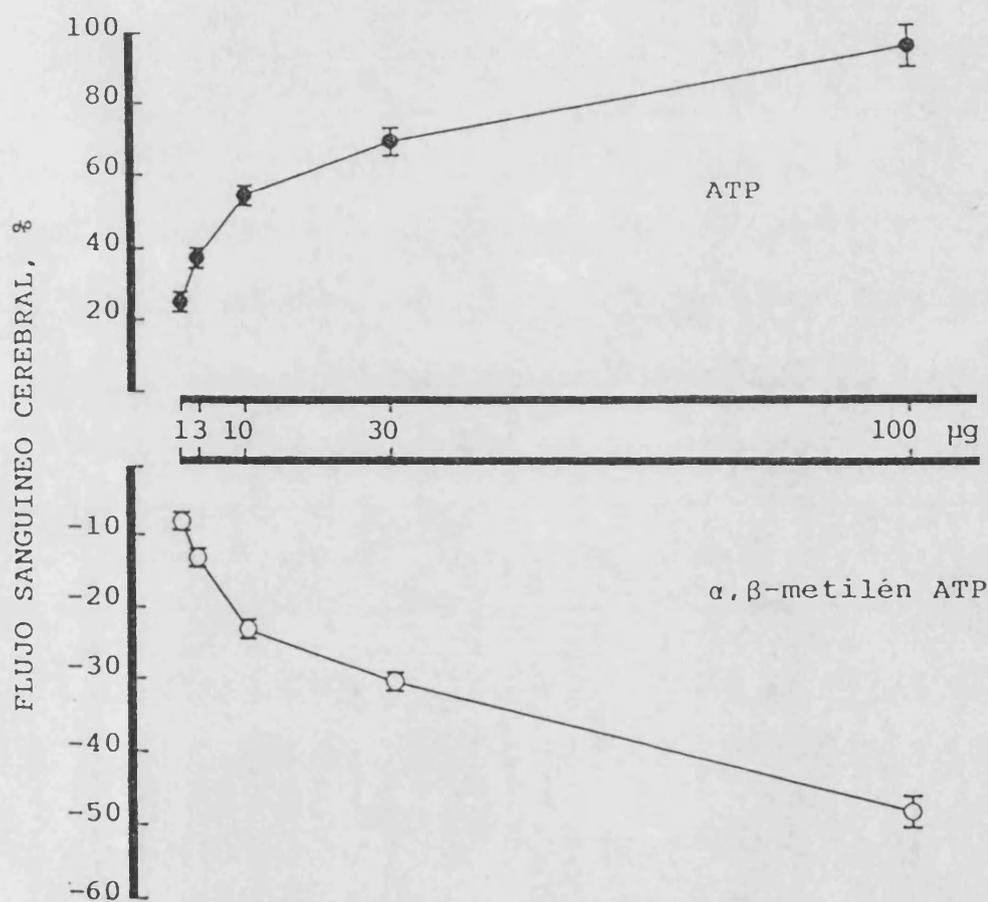


Figura 13.- Efecto de la administración intraarterial de dosis crecientes de  $\alpha,\beta$ -metilén ATP (n=9) y ATP (n=15), sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestésiar. Las variaciones de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media+EEM.

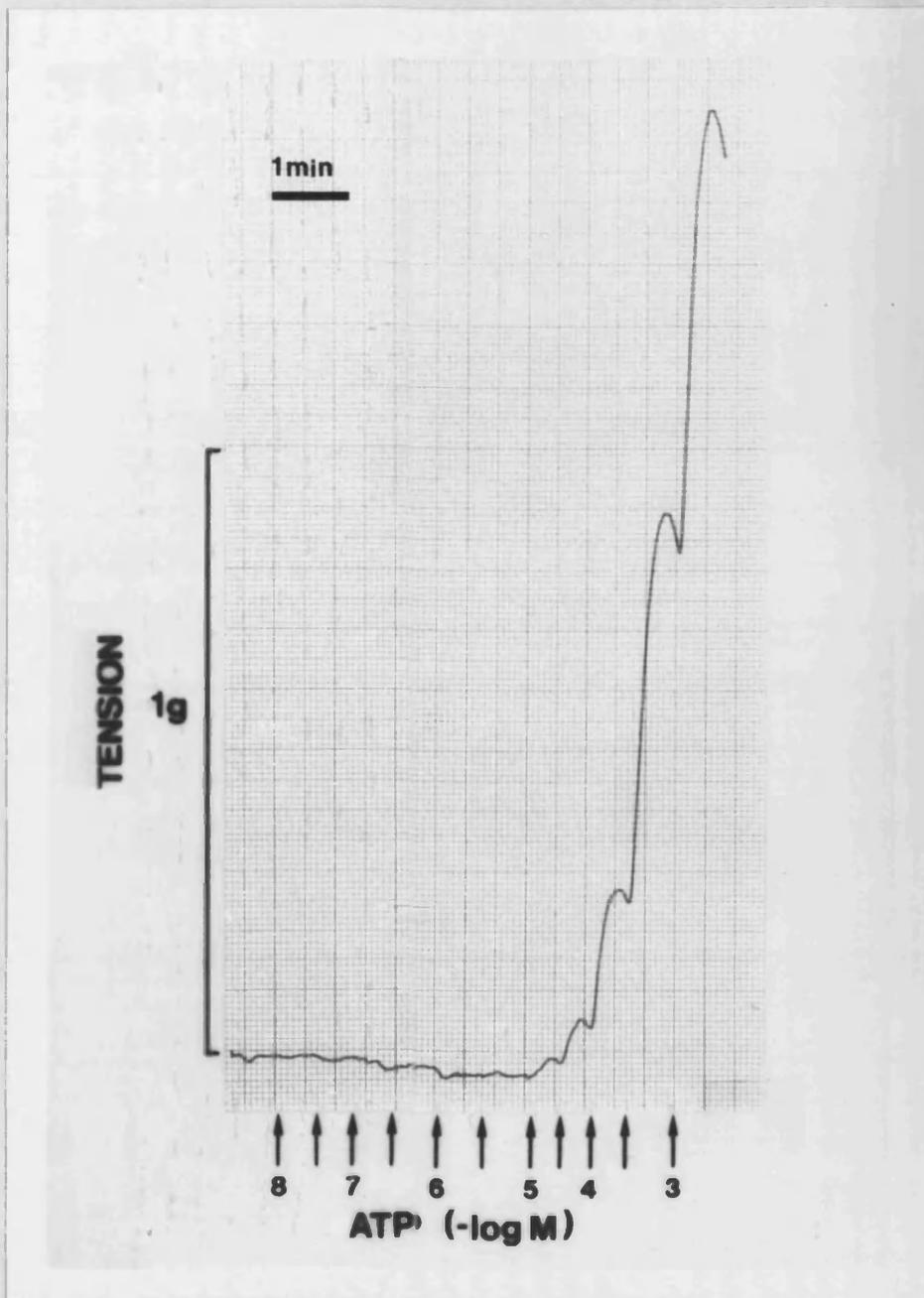


Figura 14.- Respuesta contráctil de un segmento de arteria cerebral media de cabra desprovisto de tono activo, frente a dosis acumulativas de ATP.

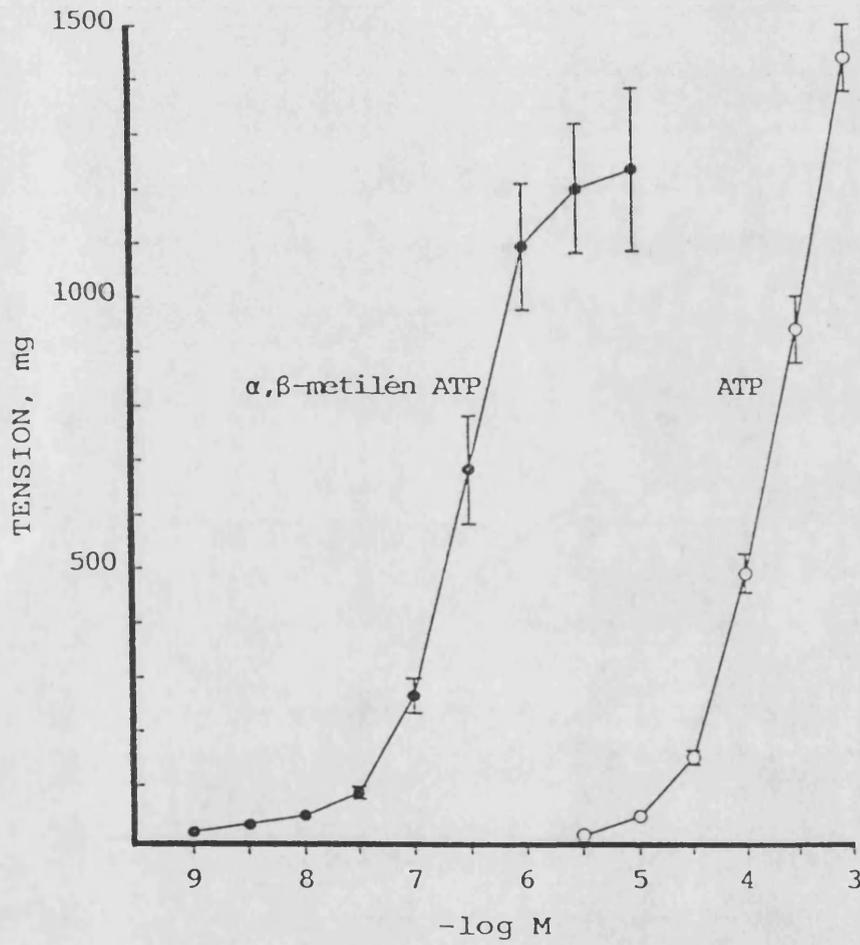


Figura 15.- Curvas dosis-repuesta de contracción de ATP (n=36) y  $\alpha,\beta$ -metilén ATP (n=24), sobre arterias cerebrales desprovistas de tono activo. Los valores representan la media+EEM.

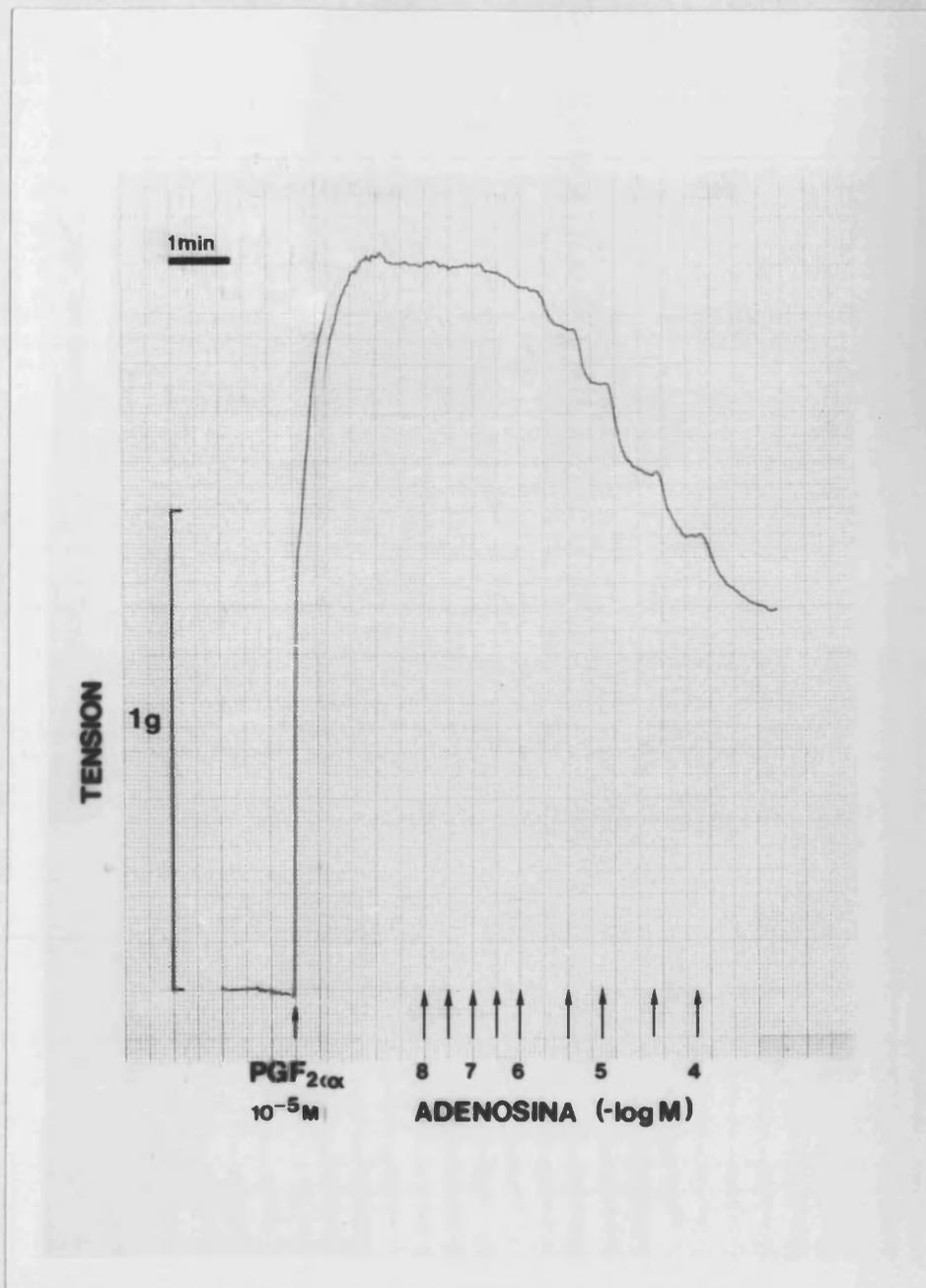


Figura 16.- Respuesta relajante de un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), frente a dosis acumulativas de adenosina.

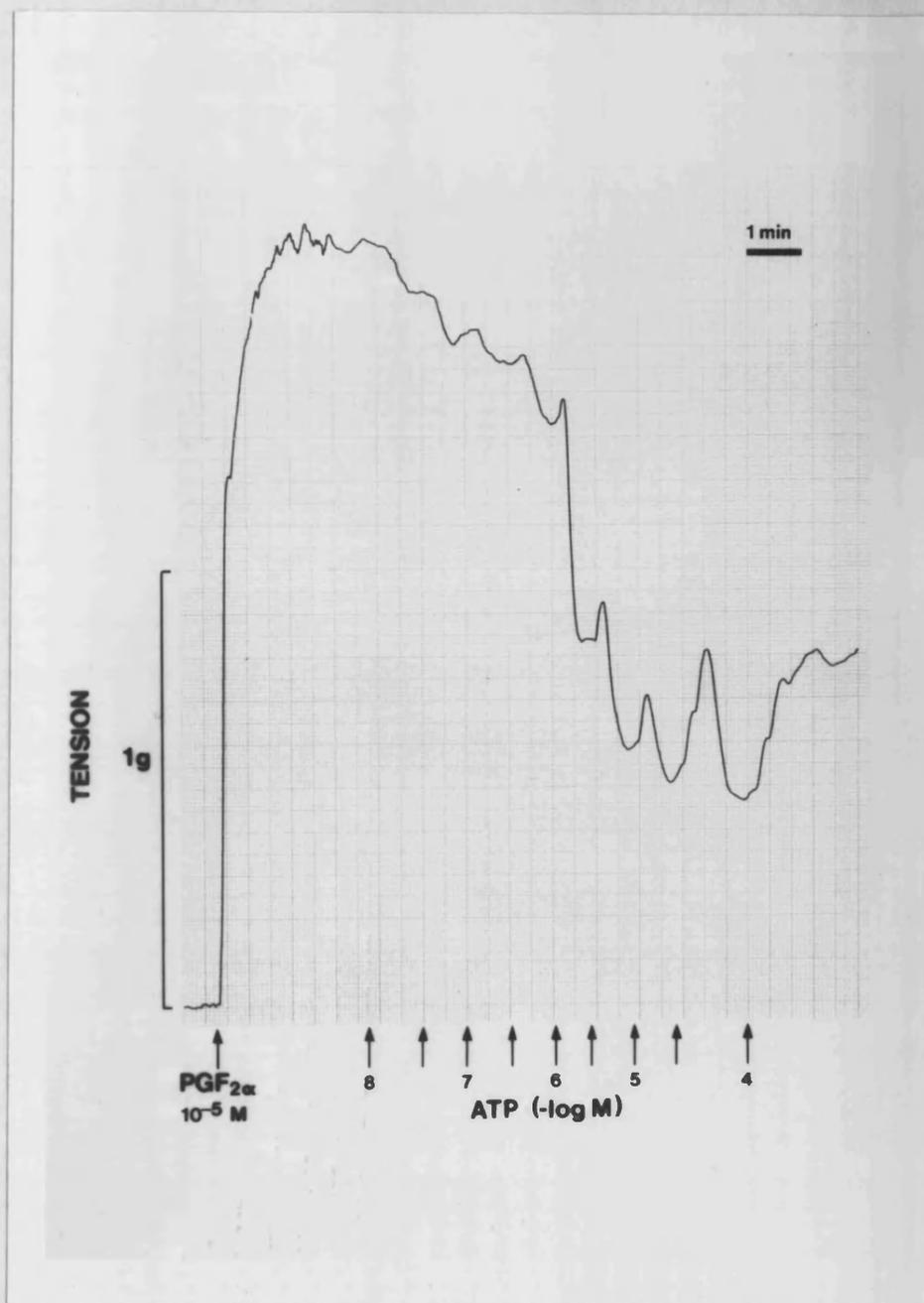


Figura 17.- Respuesta dual (contracción-relajación) de un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), frente a dosis acumulativas de ATP.

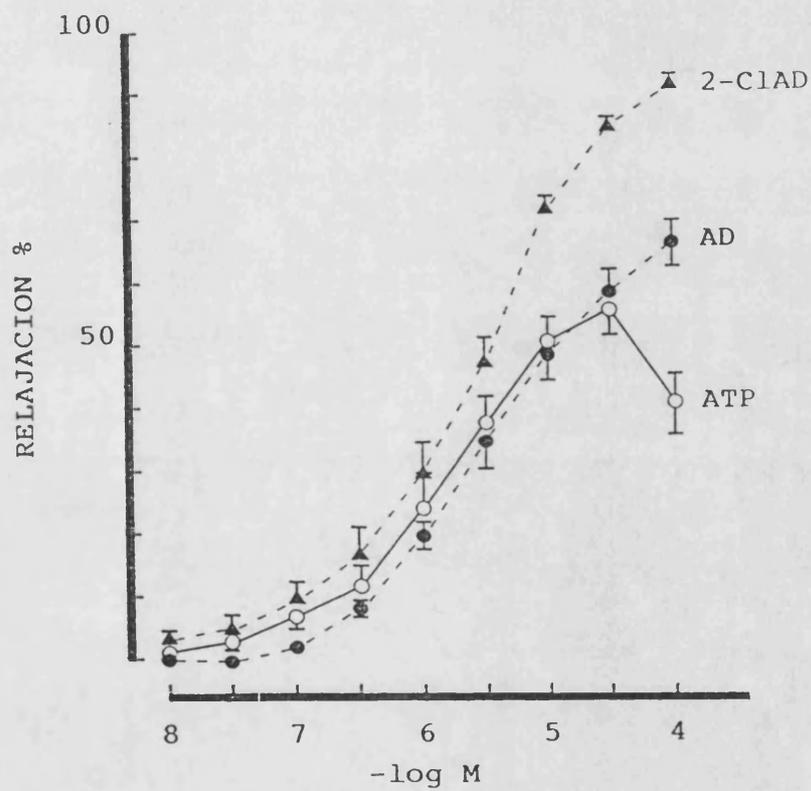


Figura 18.- Curvas dosis-respuesta de relajación de 2-cloroadenosina (2-ClAD, n=15), adenosina (AD, n=38) y ATP (n=37), sobre arterias cerebrales precontraídas. Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del tono activo previo, y representan la media+EEM.

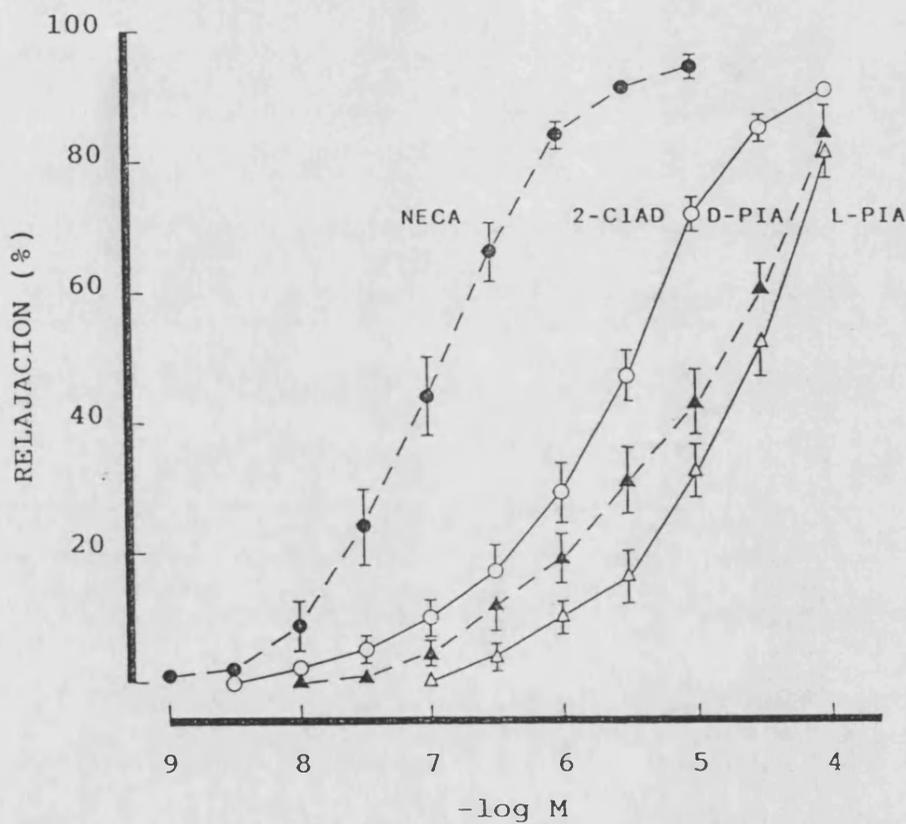


Figura 19.- Curvas dosis-respuesta de relajación de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA, n=8), 2-cloroadenosina (2-CIAD, n=15), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA, n=7) y D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA, n=8), sobre arterias cerebrales precontraídas. Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del tono activo previo, y representan la media+EEM.

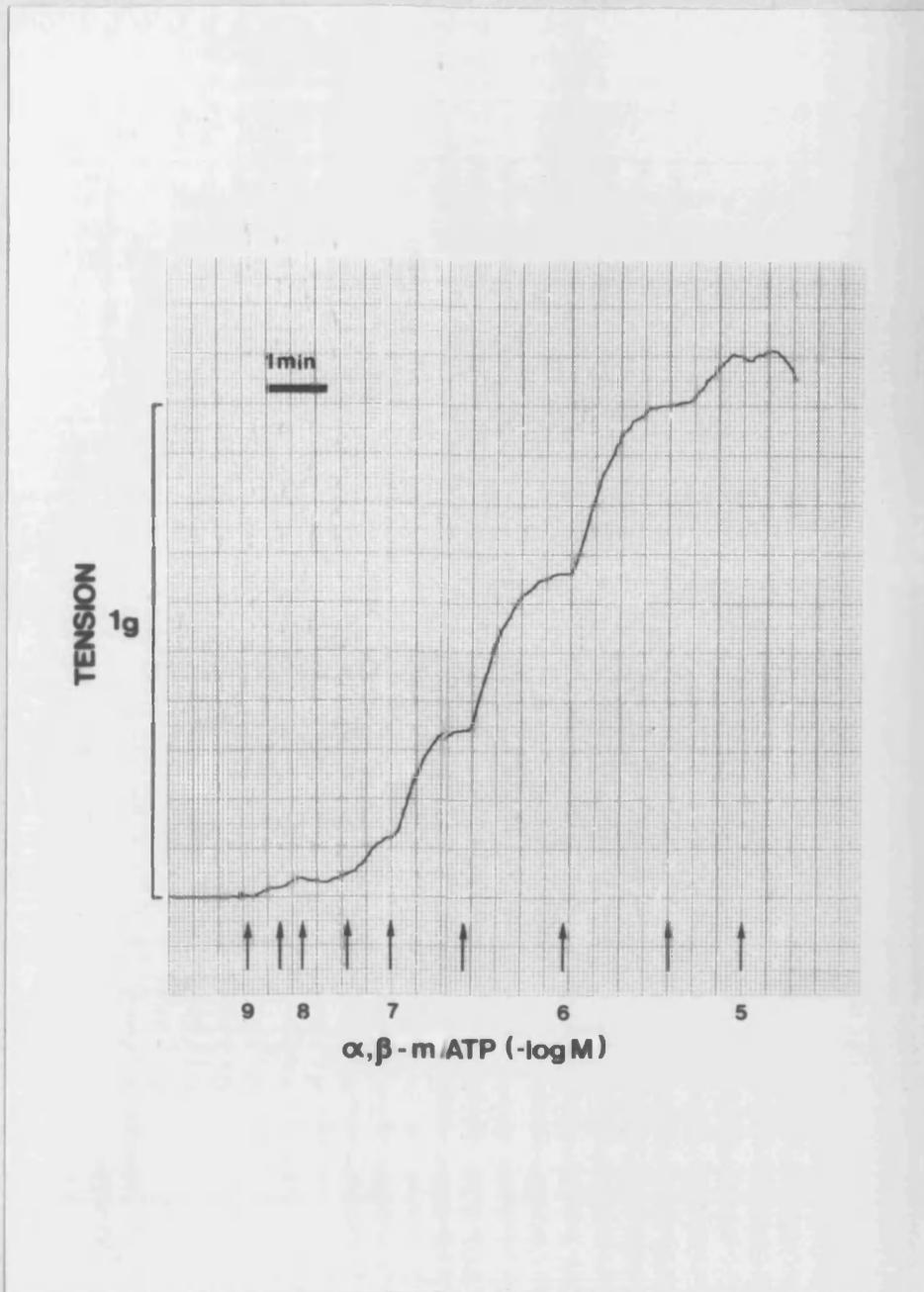


Figura 20.- Respuesta contráctil de un segmento de arteria cerebral media de cabra desprovisto de tono activo, frente a dosis crecientes de  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta$ -mATP).

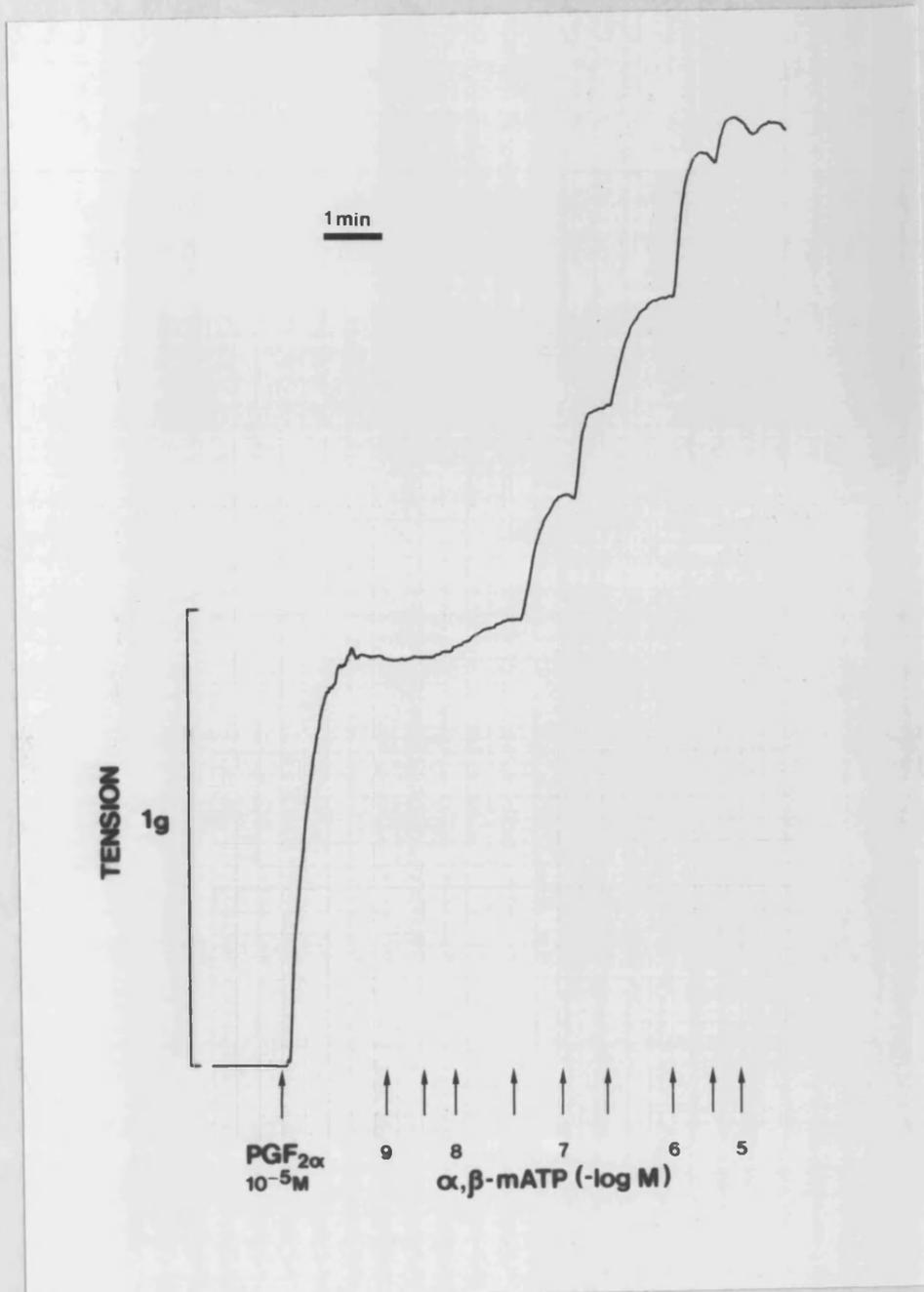


Figura 21.- Respuesta contráctil de un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), frente a dosis crecientes de  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta\text{-mATP}$ ).

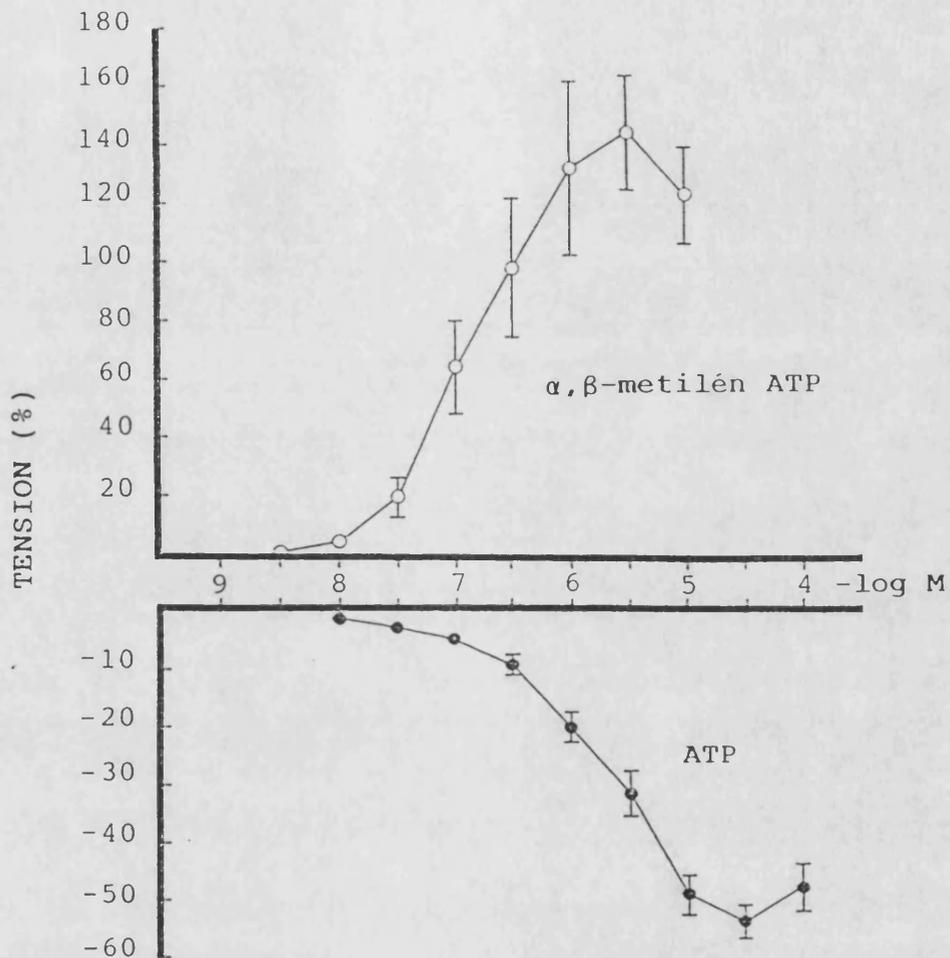


Figura 22.- Curvas dosis-respuesta de  $\alpha, \beta$ -metilén ATP (n=12) y ATP (n=37), sobre arterias cerebrales precontraídas. Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del tono activo previo, y representan la media+EEM.

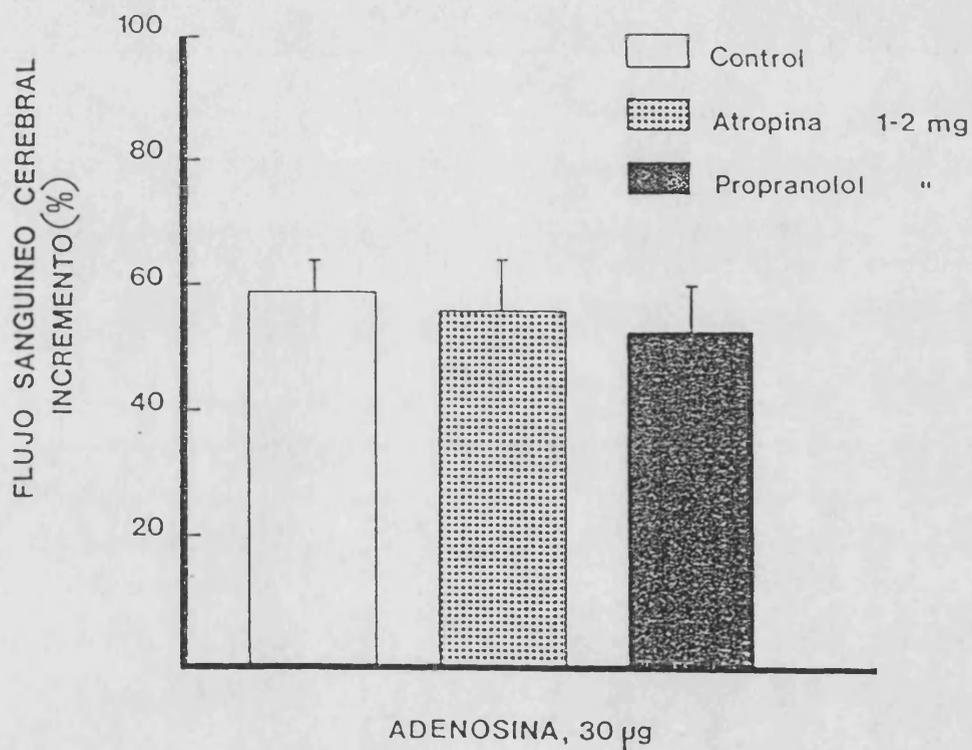


Figura 23.- Efecto de la administración intraarterial de adenosina, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control (n=11) y durante el tratamiento con atropina (n=8) y propranolol (n=7), ambos administrados a través del catéter temporal. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

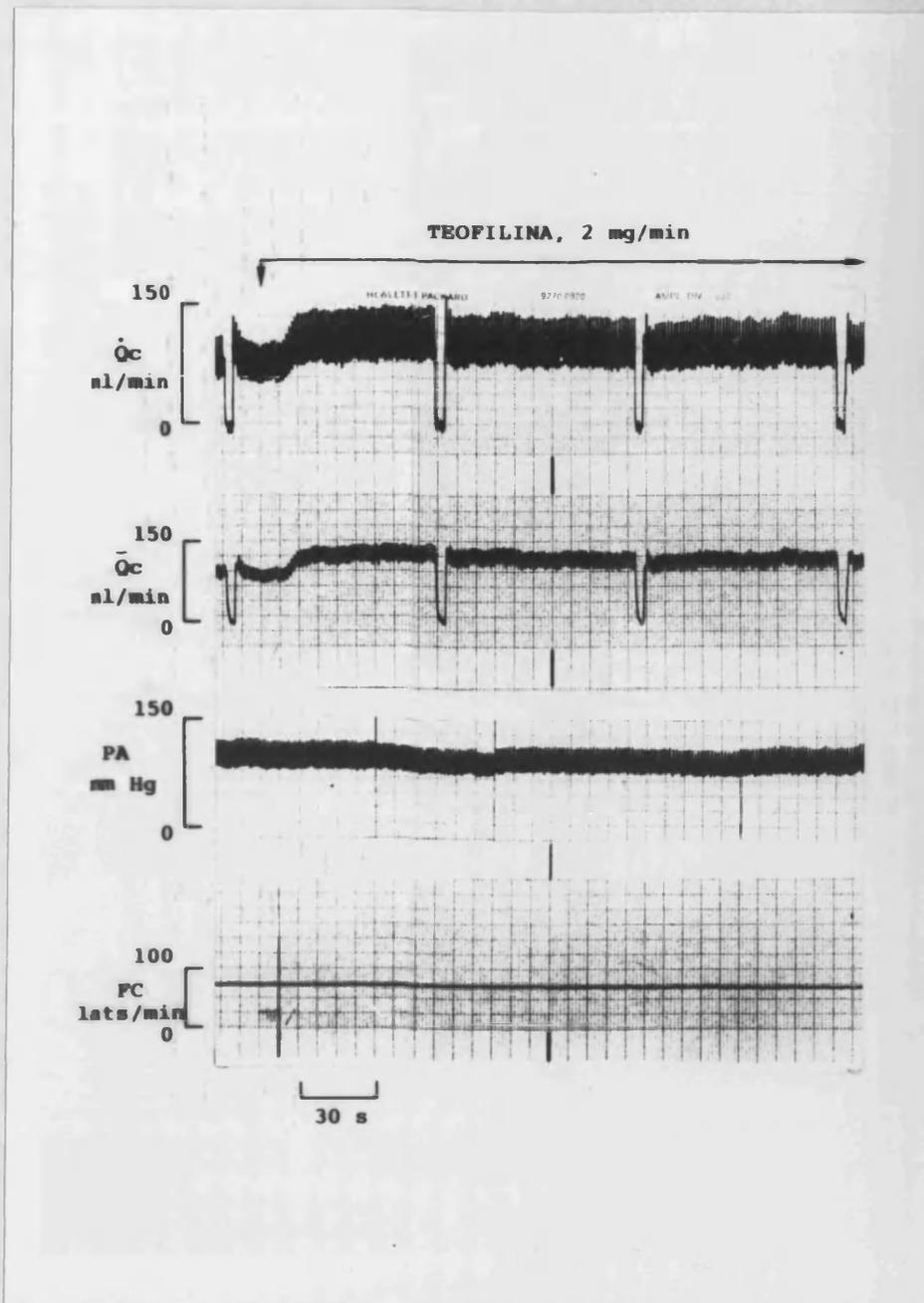


Figura 24.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC), obtenido en una cabra sin anestesiarse a la cual se le administró una infusión continua de teofilina a través del catéter temporal.

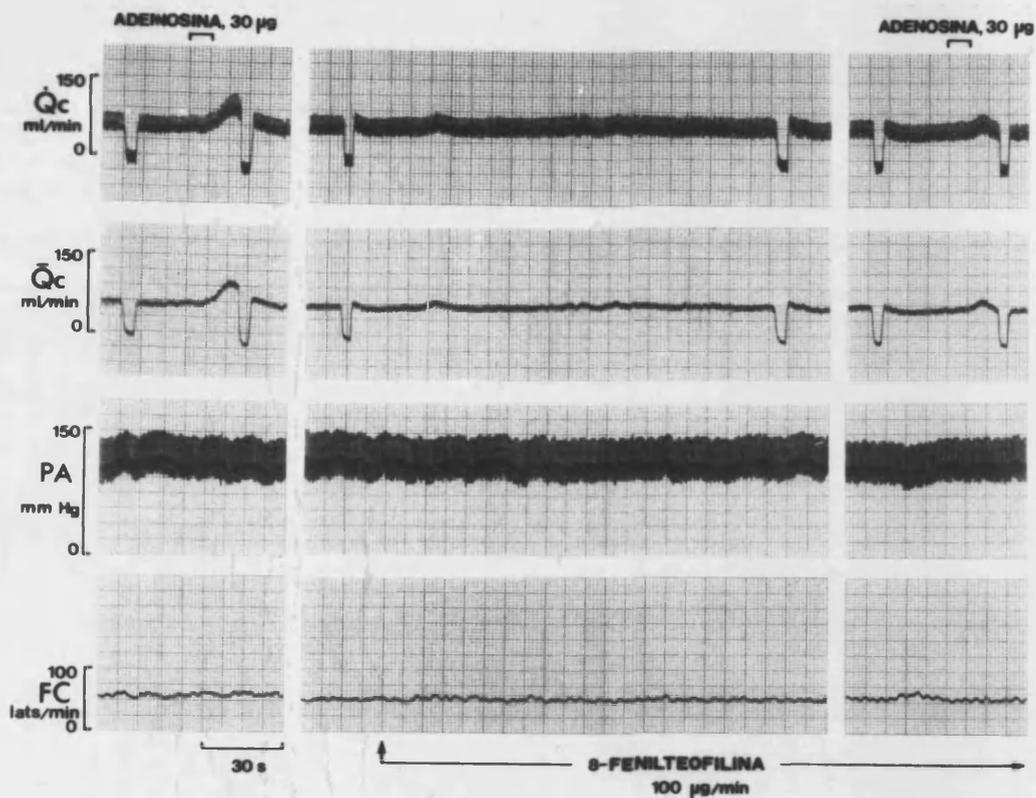


Figura 25.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC), obtenido en una cabra sin anestesiarse a la cual se le administró adenosina antes (izquierda) y durante (derecha) la infusión continua de 8-fenilteofilina, ambos a través del catéter temporal.

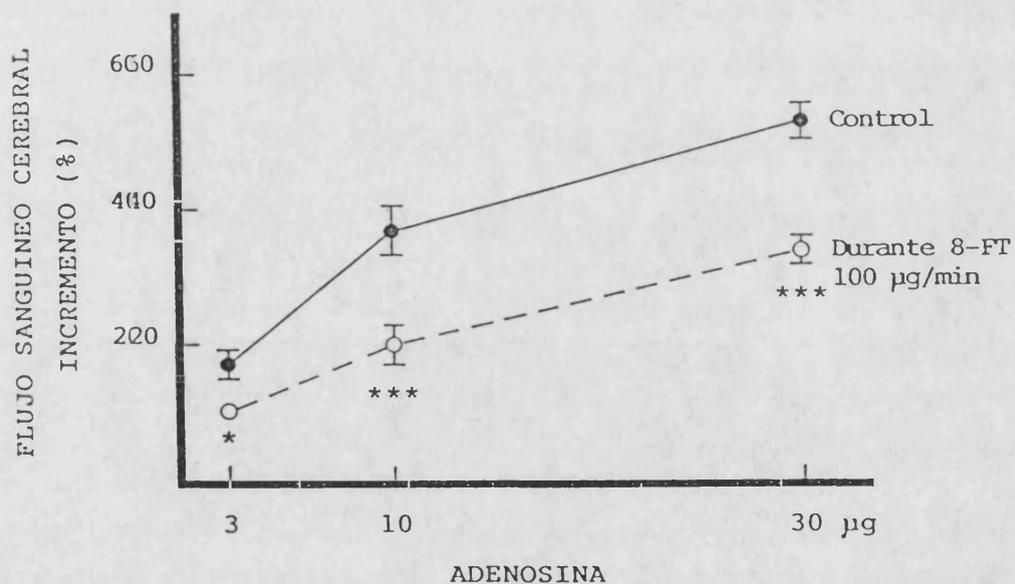


Figura 226.- Efecto de la administración intraarterial de dosis crecientes de adenosina, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT) a través del catéter temporal. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media+EEM de los datos obtenidos en 16 animales.

\*P<0.055

\*\*\*P<0.001

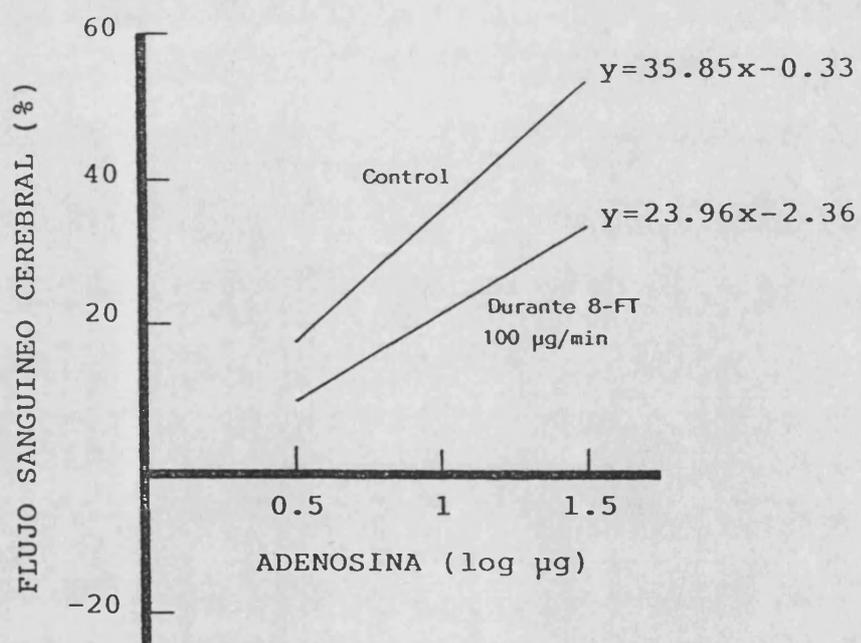


Figura 27.- Ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 3,10 y 30 µg de adenosina, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT).

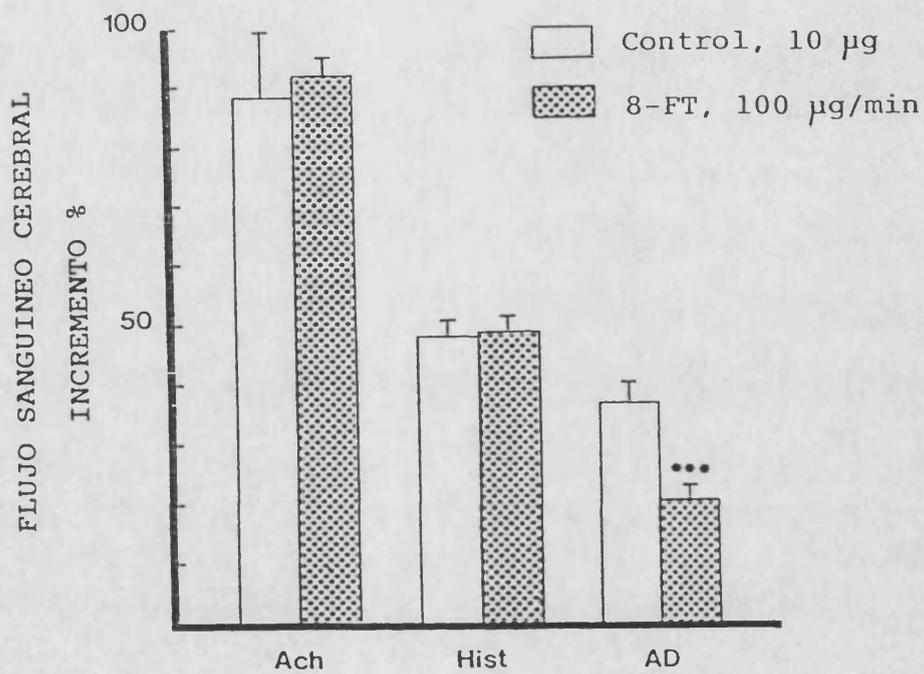


Figura 28.- Efecto de la administración intraarterial de adenosina (AD, n=8), acetilcolina (Ach, n=3) e histamina (Hist, n=4), sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestésiar, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT) a través del catéter temporal. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

\*\*\*P<0.001

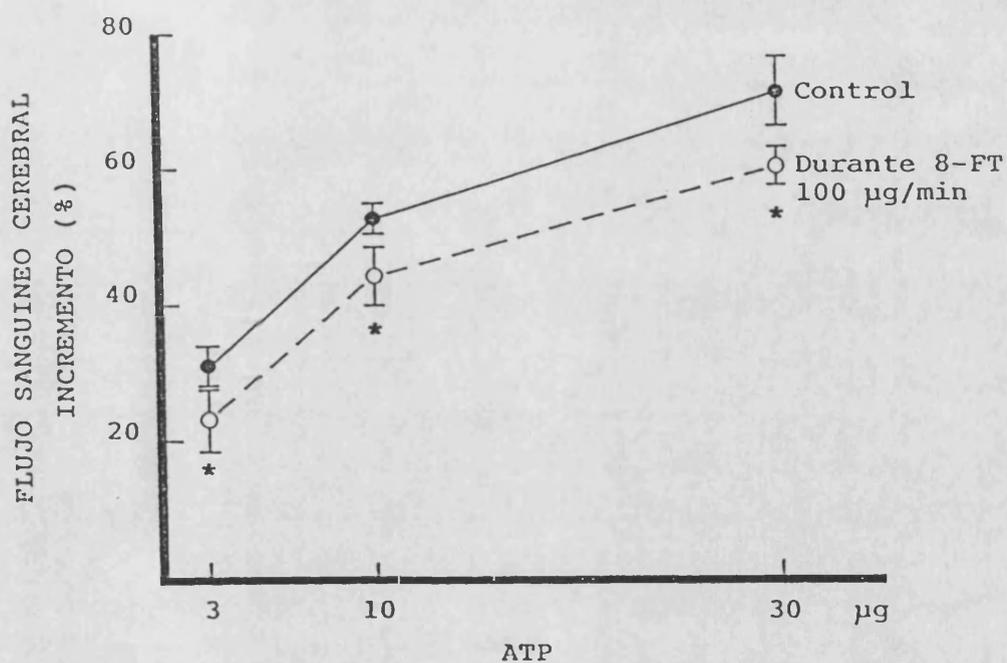


Figura 29.- Efecto de la administración intraarterial de dosis crecientes de ATP, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT) a través del catéter temporal. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media ± EEM de los datos obtenidos en 5 animales.

\*P < 0.05

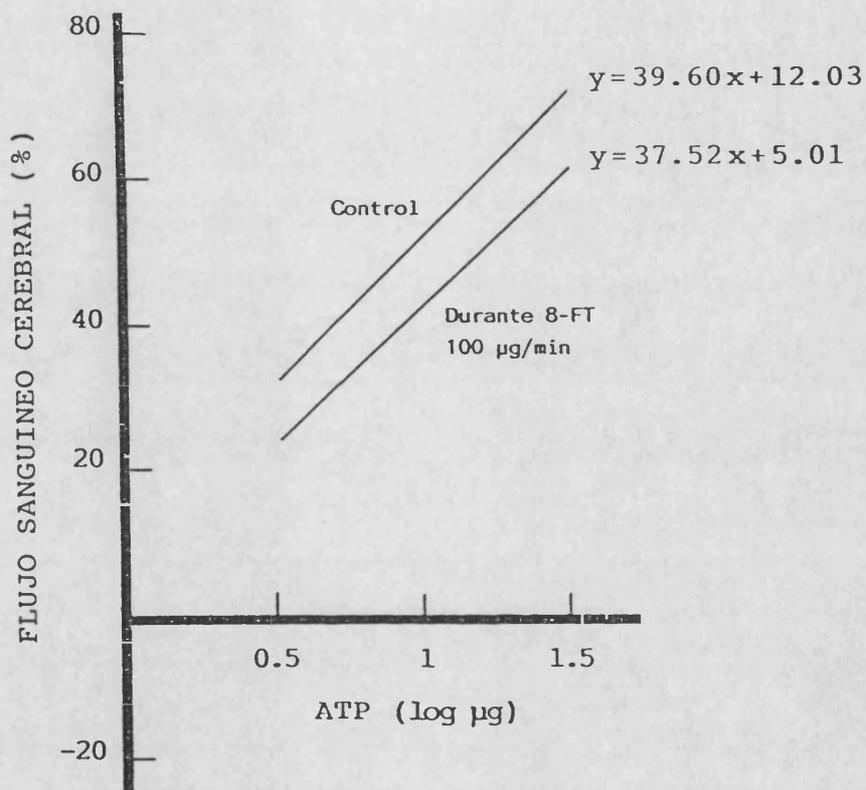


Figura 30.- Ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 3,10 y 30 µg de ATP, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT).

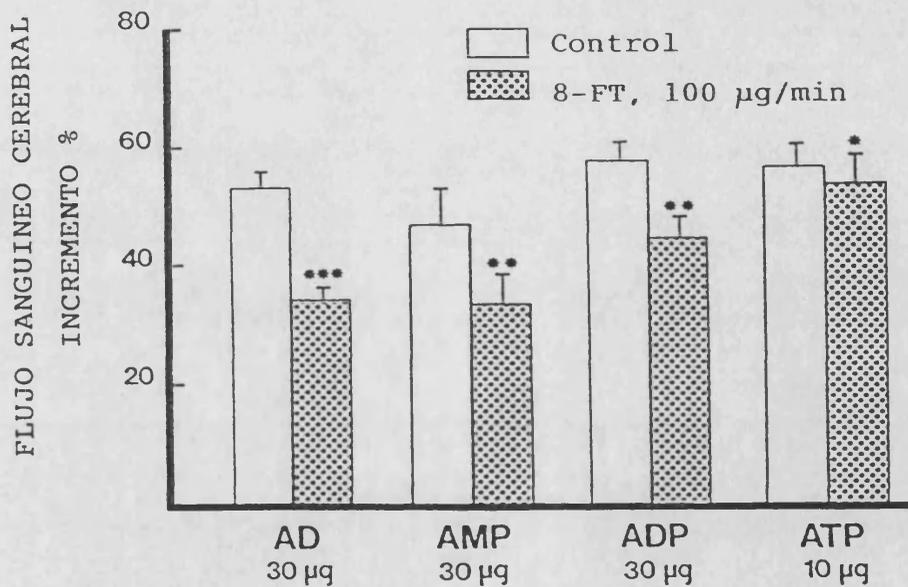


Figura 31.- Efecto de la administración intraarterial de adenosina (AD, n=11), AMP (n=5), ADP (n=5) y ATP (n=5), sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y durante la infusión continua de 8-fenilteofilina (8-FT) a través del catéter temporal. Los incrementos de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

\*P<0.05

\*\*P<0.01

\*\*\*P<0.001

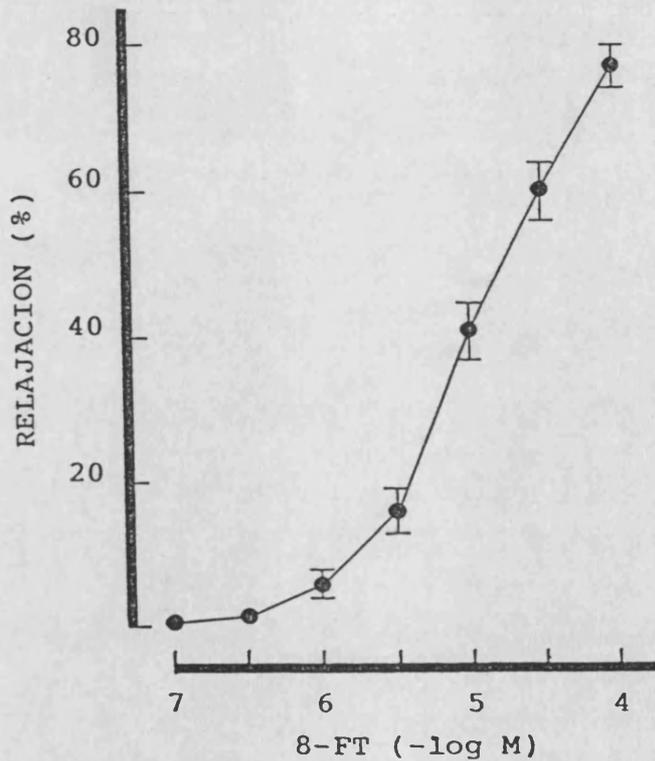


Figura 32.- Curva dosis-respuesta de relajación de 8-fenilteofilina (8-FT, n=11), sobre arterias cerebrales precontraídas. Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del tono activo previo, y representan la media+EEM.

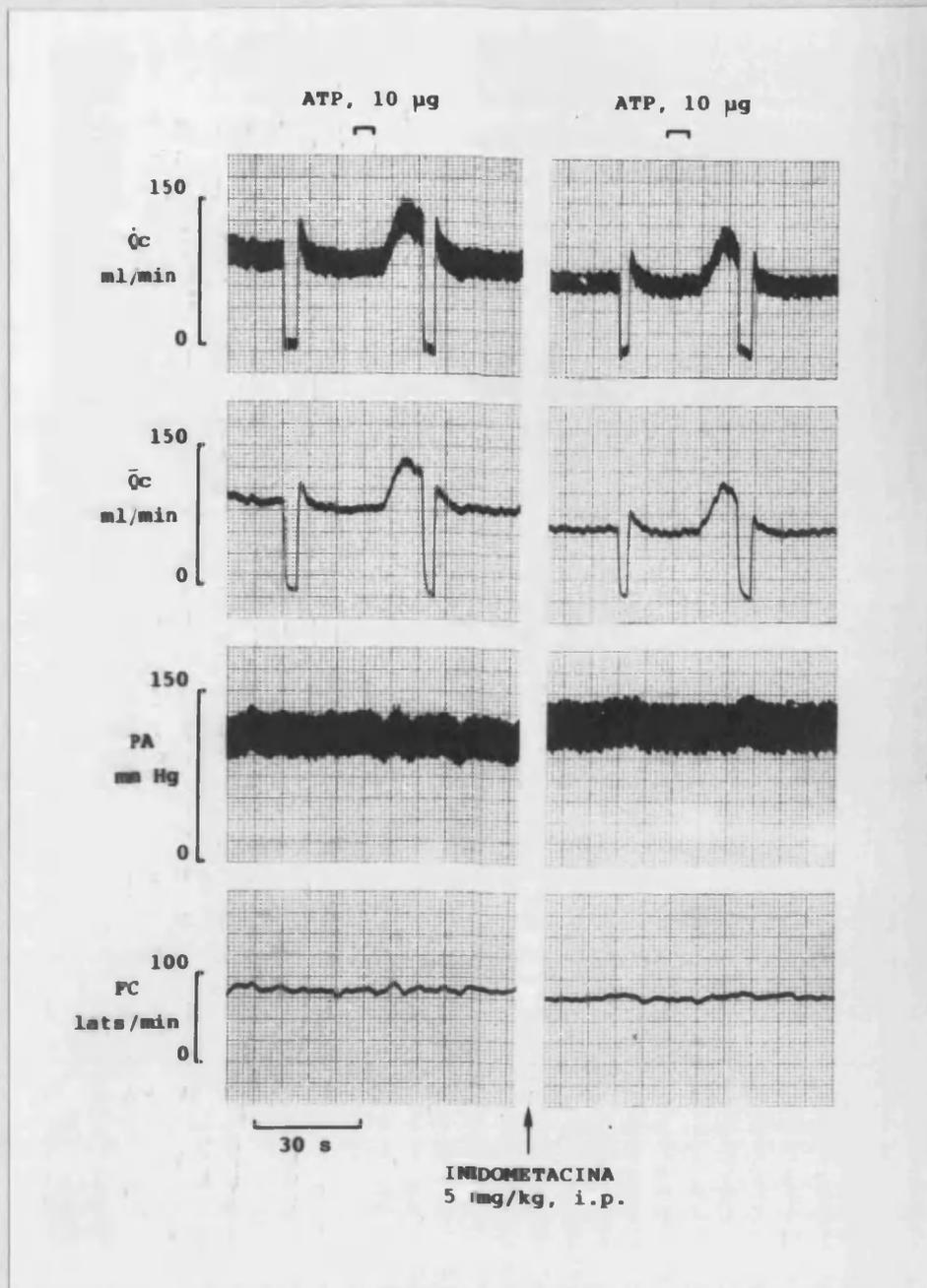


Figura 33.- Registro de flujo sanguíneo cerebral pulsátil ( $\dot{Q}_c$ ) y medio ( $\bar{Q}_c$ ), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC), obtenido en una cabra sin anestesiarse a la cual se le administró ATP a través del catéter temporal, antes (izquierda) y después (derecha) de la administración intraperitoneal de indometacina.

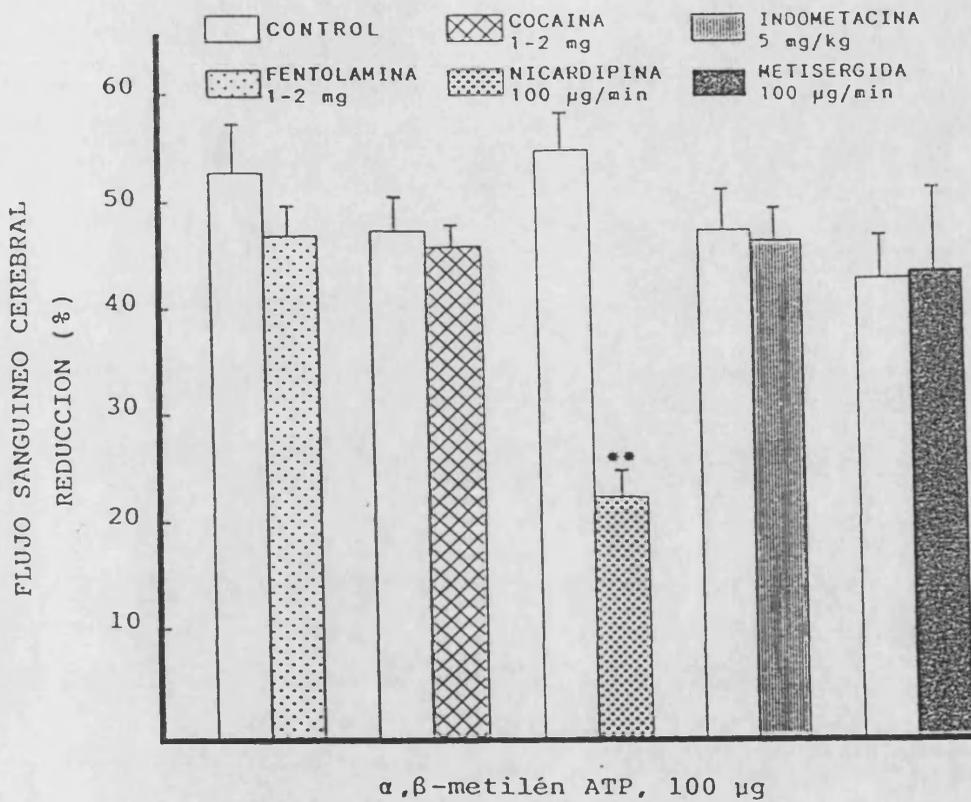


Figura 34.- Efecto de la administración intraarterial de  $\alpha,\beta$ -metilén ATP, sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y durante el tratamiento con fentolamina (n=5, intraarterial), cocaína (n=6, intraarterial), nicardipina (n=4, intraarterial), metisergida (n=4, intraarterial) e indometacina (n=5, intraperitoneal). Los valores de flujo sanguíneo cerebral se expresan porcentualmente respecto del flujo sanguíneo cerebral basal, y representan la media±EEM.

\*\*P<0.01

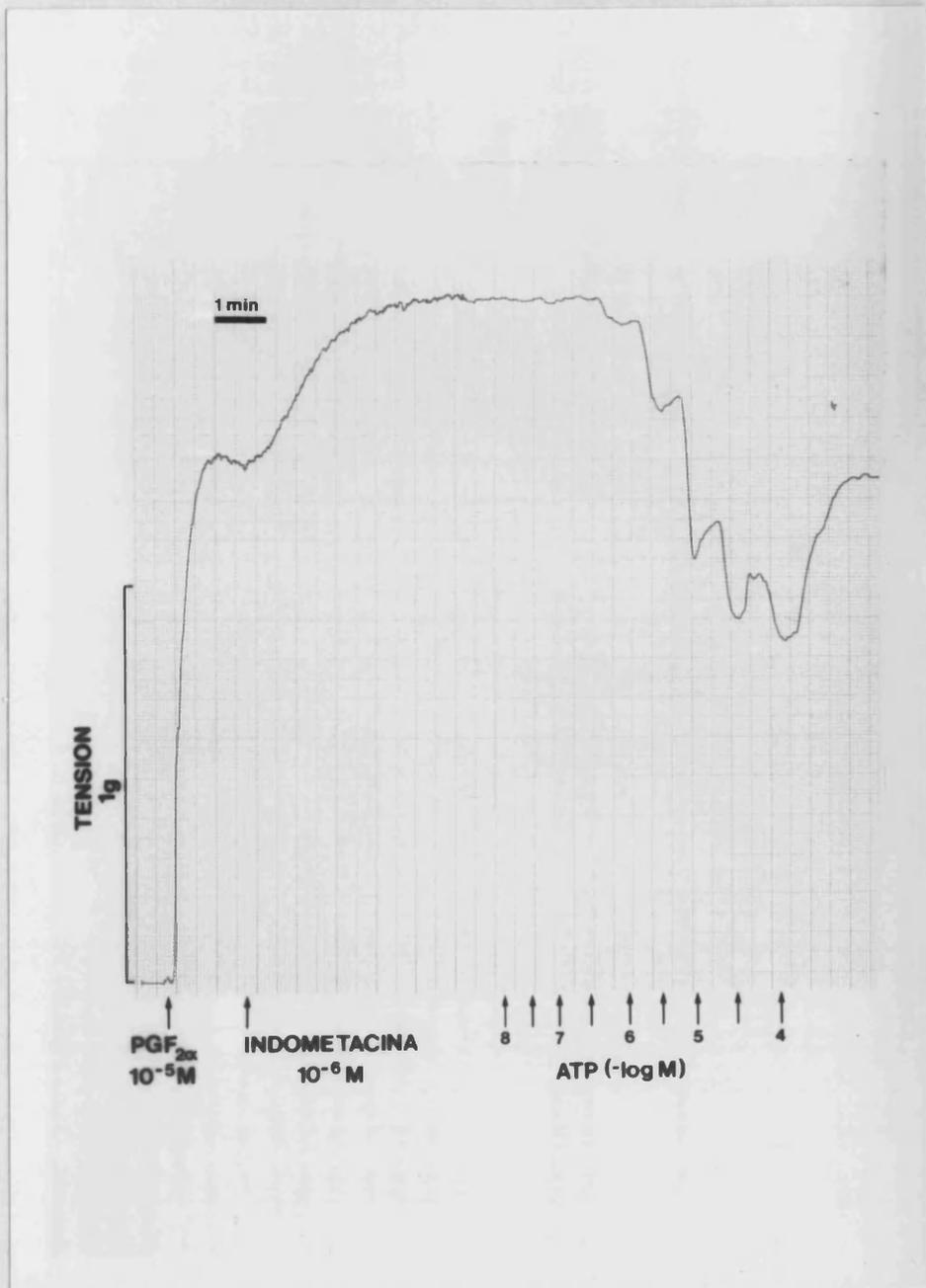


Figura 35.- Respuesta de un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), frente a dosis crecientes de ATP, previa incubación con indometacina.

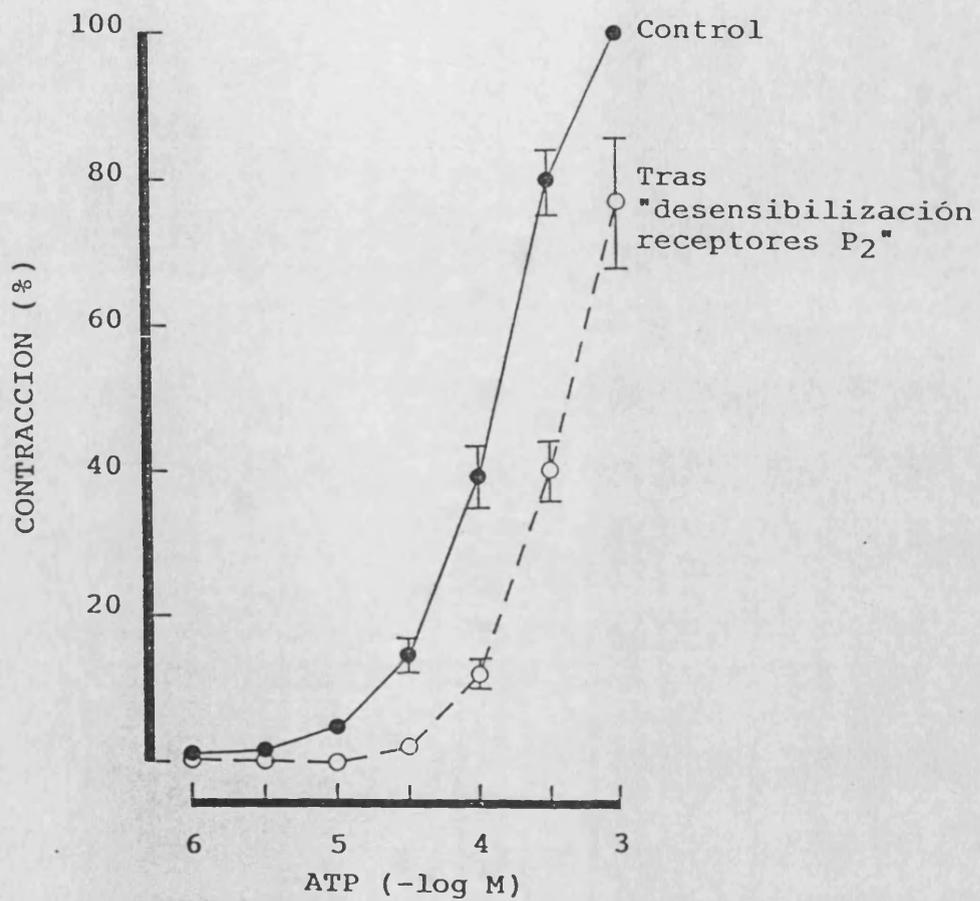


Figura 36.- Curvas dosis-respuesta de contracción de ATP (n=12) sobre arterias cerebrales desprovistas de tono activo, en situación control y tras la "desensibilización de los receptores P<sub>2</sub>". Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control, y representan la media±EEM.

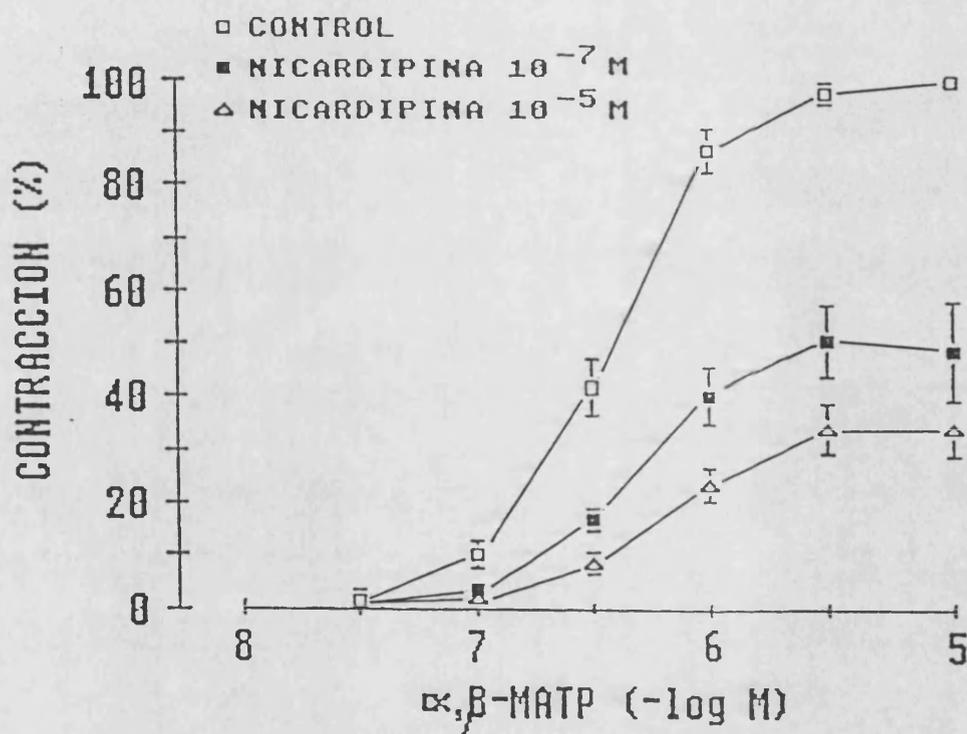


Figura 37.- Curvas dosis-respuesta de contracción de  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $\alpha,\beta\text{-mATP}$ ,  $n=15$ ) sobre arterias cerebrales desprovistas de tono activo, en situación control y durante el tratamiento con nicardipina  $10^{-7}M$  ( $n=9$ ) y  $10^{-5}M$  ( $n=12$ ). Los valores de tensión se expresan porcentualmente respecto del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control, y representan la media  $\pm$  EEM.

## TABLAS

### RECEPTORES PURINERGICOS

TIPOS	SUBTIPOS
$\boxed{P_1}$ AD>AMP>ADP>ATP	$\boxed{A_1}$ L-PIA>2-CIAD>NECA>D-PIA $\boxed{A_2}$ NECA>2-CIAD>L-PIA>D-PIA $\boxed{P}$ 2'5'-DDA>>AD
$\boxed{P_2}$ ATP>>ADP>AMP>>AD	$\boxed{P_{2x}}$ $\alpha, \beta$ -mATP= $\beta, \gamma$ -mATP>ATP=2-mSATP $\boxed{P_{2y}}$ 2-mSATP>>ATP> $\alpha, \beta$ -mATP= $\beta, \gamma$ -mATP

Tabla 1.- Clasificación de los receptores purinérgicos en función del orden de potencia de los diferentes agonistas. **AD**=adenosina; **L-PIA**=L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina; **D-PIA**=D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina; **2-CIAD**=2-cloroadenosina; **NECA**=5'-N-etilcarboxamido adenosina; **2',5'-DDA**=2',5'-didesoxiadenosina;  $\alpha, \beta$ -**mATP**= $\alpha, \beta$ -metilén ATP);  $\beta, \gamma$ -**mATP**= $\beta, \gamma$ -metilén ATP; **2-mSATP**=2-metil-tío ATP.

TABLA II.- Efecto de la inyección de adenosina en la arteria maxilar interna, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia vascular cerebral, pH, PaCO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub> de la cabra sin anestesiar.

	Control	AD, 10 µg
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	95.1±3.0	127.7±6.3*
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	102.2±2.3	101.2±2.1
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	76±1	78±3
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.08±0.04	0.80±0.08*
pH	7.46±0.01	7.46±0.01
PaCO <sub>2</sub>	32.8±2.0	31.9±1.6
PaO <sub>2</sub>	93.5±4.1	95.1±3.8

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 18 animales.

\* P<0.05

<u><math>y=mx+b</math></u>		<u><math>y=\bar{y}+m_c(x-\bar{x})</math></u>
$y=41.6x+13.1$	ATP →	$y=75.5+40.0(x-1.5)$
$y=38.4x-1.8$	AD →	$y=52.3+40.0(x-1.4)$
$y=39.9x-9.4$	ADP →	$y=44.9+40.0(x-1.3)$
$y=40.7x-12.4$	AMP →	$y=39.8+40.0(x-1.3)$

$$m_c = \frac{W_1 \cdot m_1 + W_2 \cdot m_2 + W_3 \cdot m_3 + W_4 \cdot m_4}{W_1 + W_2 + W_3 + W_4}$$

$$W = \frac{1}{[EE(m)]^2}$$

Tabla III.- Ecuaciones de regresión reales (izquierda) y transformadas (derecha) ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g}$  de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP.  $m$ =pendiente;  $b$ =intersección en el origen;  $m_c$ =pendiente común;  $W$ =factor de ponderación;  $EE(m)$ =error estándar de la pendiente.

	$S_x^2$	$S_{xy}$	$S_y^2$	Suma de g.l. cuadrados	Varianza	F
Total	21.62	928.36	62370.68		22507.02	
Entre grupos				3	-9993.16	-3331.05
Dentro grupos	21.15	845.04	46277.10	84	12513.86	148.97

	AMP	ADP	AD	ATP
$\bar{X}$ :	-12.39	-9.37	-1.80	13.10
n:	(11)	(11)	(37)	(30)

AMP	-			
ADP	0.72	-		
AD	2.52	1.88	-	
ATP	8.41**	7.94**	9.09**	-

ATP > AD = ADP = AMP

Tabla IV.- Análisis de covarianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a las intersecciones en el origen de las ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g}$  de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP.

\*\*P<0.01

	ATP	AD	ADP
AD	3.09**		
ADP	4.26**	1.38	
AMP	4.78**	1.54	1.12

$$d = \log A - \log B$$

$$\text{potencia relativa} = \text{antilog } d$$

Tabla V.- Potencia relativa entre adenosina (AD), AMP, ADP y ATP, incrementando el flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestesiarse cuando se administran intraarterialmente. **d**=distancia horizontal entre dos ecuaciones de regresión paralelas; **A** y **B**=dosis equipotentes de los agonistas entre los que se establece la comparación.

\*\*P<0.01

TABLA VI.- Efecto de la inyección de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA) en la arteria maxilar interna, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiarse.

	NECA, 100 µg		
	Control	Respuesta I	Respuesta II
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	110.4±14.7	206.4±26.8**	173.6±25.1**
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	82.3±7.7	80.6±11.1	73.1±10.7
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	62±4	71±5*	96±5**
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	0.81±0.13	0.40±0.05**	0.43±0.05**

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 5 animales.

\* P<0.05

\*\* P<0.01

Suma de Grados de  
cuadrados libertad Varianza F

Total	8362.24	1		
Entre grupos	9209.81	3	3069.94	13.20**
Dentro grupos	16979.88	73	232.60	

	L-PIA	NECA	AD	2-ClAD
$\bar{X}$ :	15.68	30.97	38.39	39.60
n:	(10)	(12)	(37)	(22)

L-PIA	-			
NECA	6.20**	-		
AD	11.14**	3.91**	-	
2-ClAD	10.45**	3.98*	0.72	-

2-ClAD = AD > NECA > L-PIA

Tabla VII.- Análisis de covarianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a las pendientes de las ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu$ g de 2-cloroadenosina (2-ClAD), adenosina (AD), 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA) y L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA).

\*P<0.05

\*\*P<0.01

	$S_x^2$	$S_{xy}$	$S_y^2$	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	F
Total	19.56	615.59	51392.23		32018.45		
Entre grupos				3	-17897.37	-5965.79	-30.84**
Dentro grupos	19.20	663.53	37051.92	73	14121.08	193.43	

	AD	L-PIA	NECA	2-ClAD
$\bar{X}$ :	-1.80	3.78	20.87	21.55
n:	(37)	(10)	(12)	(22)
AD	-			
L-PIA	7.99**	-		
NECA	3.51*	9.50**	-	
2-ClAD	6.34**	14.33**	4.40**	-

2-ClAD > NECA > L-PIA > AD

Tabla VIII.- Análisis de covarianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a las intersecciones en el origen de las ecuaciones de regresión ajustadas a los valores de flujo sanguíneo cerebral obtenidos con las dosis de 10 y 100  $\mu$ g de 2-cloroadenosina (2-ClAD), 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA) y adenosina (AD).

\*P<0.05

\*\*P<0.01

TABLA IX.- Efecto de la inyección de  $\alpha, \beta$ -metilén ATP ( $\alpha, \beta$ -mATP) en la arteria maxilar interna, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiar.

	Control	$\alpha, \beta$ -mATP, 100 $\mu$ g
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	91.7 $\pm$ 2.9	48.7 $\pm$ 2.8**
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	112.6 $\pm$ 3.5	111.8 $\pm$ 4.3
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	73 $\pm$ 4	75 $\pm$ 3
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.22 $\pm$ 0.03	2.30 $\pm$ 0.05**

Los valores representan la media $\pm$ FEM de los datos obtenidos en 4 animales.

\*\* P<0.01

	ED <sub>50</sub> (M)	Emáx (%)	n
AD	3.83 (3.43-4.60) × 10 <sup>-6</sup>	-66.01 ± 2.33	38
AMP	4.50 (2.73-7.43) × 10 <sup>-6</sup>	-51.46 ± 3.06	13
ADP	5.44 (3.84-7.70) × 10 <sup>-7</sup>	-45.50 ± 8.57	10
ATP	1.84 (1.38-2.57) × 10 <sup>-6</sup>	-58.66 ± 2.20	37

Tabla X.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx</sub>, % respecto del tono activo previo ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta de relajación (n) de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP, sobre arterias cerebrales precontraídas.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F
Total	13.01	59		
Entre grupos	4.80	2	2.40	16.67**
Dentro grupos	8.21	57	0.14	

	AMP	AD	ATP	ADP
$\bar{X}$ :	5.34	5.41	5.73	6.26
n:	(13)	(38)	(37)	(10)

AMP	-			
AD	0.82	-		
ATP	4.57**	5.23**	-	
ADP	8.26**	9.03**	5.62**	-

ADP > ATP > AD = AMP

Tabla XI.- Análisis de varianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a los valores de  $pD_2$  ( $-\log ED_{50}$ ) correspondientes a las curvas dosis-respuesta de relajación de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP, sobre arterias cerebrales precontraídas.

\*\*P<0.01

Suma de Grados de  
cuadrados libertad Varianza F

Total	26625.27	97		
Entre grupos	4434.22	3	1478.07	6.26**
Dentro grupos	22191.35	94	236.08	

	ADP	AMP	ATP	AD
$\bar{X}$ :	45.50	51.46	58.66	66.01
n:	(10)	(13)	(37)	(38)

ADP	-			
AMP	1.30	-		
ATP	3.39*	2.05	-	
AD	5.31**	4.16*	1.16	-

AD	ATP	AMP	ADP
----	-----	-----	-----

Tabla XII.- Análisis de varianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a los valores de efecto máximo correspondientes a las curvas dosis-respuesta de relajación de adenosina (AD), AMP, ADP y ATP, sobre arterias cerebrales precontraídas.

\*P<0.05

\*\*P<0.01

	ED <sub>50</sub> (M)	Emáx (%)	n
NECA	1.03 (0.54-1.95) × 10 <sup>-7</sup>	-93.92 ± 1.61	8
2-ClAD	2.28 (1.38-3.80) × 10 <sup>-6</sup>	-91.38 ± 1.14	15
D-PIA	7.60 (4.12-14.02) × 10 <sup>-6</sup>	-83.92 ± 4.29	8
L-PIA	1.82 (1.38-2.39) × 10 <sup>-5</sup>	-85.57 ± 4.10	7

Tabla XIII.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx</sub>, % respecto del tono activo previo ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta de relajación (n) de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), 2-cloroadenosina (2-ClAD), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA) y D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA), sobre arterias cerebrales precontraídas.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F
Total	7.88	29		
Entre grupos	4.17	2	2.08	15.17**
Dentro grupos	3.71	27	0.14	

	L-PIA	D-PIA	2-CIAD	NECA
$\bar{X}$ :	4.74	5.11	5.64	6.98
n:	(7)	(8)	(15)	(8)
L-PIA	-			
D-PIA	2.70	-		
2-CIAD	7.68**	4.58**	-	
NECA	16.36**	14.14**	11.57**	-

NECA > 2-CIAD > D-PIA = L-PIA

Tabla XIV.- Análisis de varianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a los valores de  $pD_2$  ( $-\log ED_{50}$ ) correspondientes a las curvas dosis-respuesta de relajación de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), 2-cloroadenosina (2-CIAD), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA) y D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA), sobre arterias cerebrales precontraídas.

\*\*P<0.01

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F
Total	2919.63	39		
Entre grupos	590.30	3	196.77	3.04*
Dentro grupos	2329.33	36	64.70	

	D-PIA	L-PIA	2-ClAD	NECA
$\bar{X}$ :	83.92	85.57	91.38	93.92
n:	(8)	(7)	(15)	(8)

D-PIA	-			
L-PIA	0.56	-		
2-ClAD	3.00	2.23	-	
NECA	3.51	2.84	1.02	-

$$\text{NECA} = 2\text{-ClAD} = \text{L-PIA} = \text{D-PIA}$$

Tabla XV.- Análisis de varianza (arriba) y test de Newman-Keuls (abajo), aplicados a los valores de efecto máximo correspondientes a las curvas dosis-respuesta de relajación de 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), 2-cloroadenosina (2-ClAD), L-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (L-PIA) y D-N<sup>6</sup>-(2-fenil isopropil)adenosina (D-PIA), sobre arterias cerebrales precontraídas.

TABLA XVI.- Efecto de la inyección de teofilina en la arteria maxilar interna, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiar.

	Control	Teofilina, 1 mg
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	106.1±7.7	151.3±9.0*
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	105.9±1.3	106.2±1.3
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	71±3	71±3
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.02±0.04	0.71±0.05*

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 6 animales.

\* P<0.05

TABLA XVII.- Efecto de adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y durante la infusión continua de teofilina.

FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min x 100 g)				
Tratamiento	Control	Adenosina (30 µg)	Diferencia	
			Absoluta	%
-	95.5±7.5	155.1±15.9	58.9±9.2	60.4±6.5
Durante Teofilina 100 µg/min	97.3±10.3	149.0±19.2	51.8±9.7**	51.1±5.9
Durante Teofilina 1 mg/min	100.6±6.9	145.7±15.1	45.3±8.8**	42.8±7.0**

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 6 animales.

\*\* P<0.01

TABLA XVIII.- Efecto de la infusión de 8-fenilteofilina (8-FT) en la arteria maxilar interna, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia vascular cerebral, pH, PaCO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub> de la cabra sin anestésiar.

	Control	8-FT, 100 µg/min
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	94.2±4.1	96.0±3.9
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	103.1±4.7	101.3±3.8
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	76±3	77±2
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.09±0.03	1.05±0.03
pH	7.46±0.01	7.46±0.01
PaCO <sub>2</sub>	33.7±1.8	29.3±2.5
PaO <sub>2</sub>	92.8±3.6	90.2±3.8

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 6 animales.

		ED <sub>50</sub> (M)	Emáx (%)	n
Adenosina	C	4.26 (2.84-6.16) × 10 <sup>-6</sup>	-65.4 ± 3.7	9
	E	4.65 (3.14-6.88) × 10 <sup>-6</sup>	-66.9 ± 4.7	
ATP	C	5.01 (3.02-8.29) × 10 <sup>-6</sup>	-56.2 ± 4.9	5
	E	2.92 (2.31-4.65) × 10 <sup>-6</sup>	-42.1 ± 2.6*	

Tabla XIX.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx</sub>, % respecto del tono activo previo ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta (n) de adenosina y ATP sobre arterias cerebrales precontraídas, en situación control (C) y en presencia (E) de 8-fenilteofilina (3 × 10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> M).

\*P < 0.05

TABLA XX.- Efecto de la administración intraperitoneal de indometacina, sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral de la cabra sin anestesiar.

	Control	Indometacina, 5 mg/kg
FLUJO SANGUINEO CEREBRAL (ml/min por 100 g)	100.8±22.5	72.2±16.5*
PRESION ARTERIAL (mm Hg)	107.5±20.5	117.9±22.0*
FRECUENCIA CARDIACA (latidos/min)	101±14	84±15*
RESISTENCIA VASCULAR CEREBRAL (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.29±0.38	1.98±0.52*

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 4 animales.

\* P<0.05

TABLA XXI.- Efecto de ATP sobre el flujo sanguíneo cerebral de la cabra sin anestesiarse, en situación control y tras la administración intraperitoneal de indometacina.

FLUJO SANGUÍNEO CEREBRAL (ml/min x 100 g)				
Tratamiento	Control	ATP (10 µg)	Diferencia	
			Absoluta	%
-	95.7±16.5	149.5±22.3	52.8±7.4	57.1±7.3
Tras indometacina 5 mg/kg	78.2±11.8*	136.6±18.3	58.4±7.35	78.3±7.8**

Los valores representan la media±EEM de los datos obtenidos en 6 animales.

\* P<0.05

\*\* P<0.01

		ED <sub>50</sub> (M)	E <sub>máx</sub> (%)	n
INDOMETACINA 10 <sup>-7</sup> M	C	0.76 (0.24-2.35) × 10 <sup>-6</sup>	-55.9 ± 6.0	5
	E	1.04 (0.37-2.90) × 10 <sup>-6</sup>	-60.6 ± 10.6	
INDOMETACINA 10 <sup>-6</sup> M	C	2.11 (0.98-4.57) × 10 <sup>-6</sup>	-64.1 ± 8.5	5
	E	3.09 (1.69-5.62) × 10 <sup>-6</sup>	-58.7 ± 5.6	

Tabla XXII.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx</sub>, % respecto del tono activo previo ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta (n) de ATP sobre arterias cerebrales precontraídas, en situación control (C) y en presencia (E) de indometacina.

		ED <sub>50</sub> (M)	Emáx (%)	n
REPETICION	C	1.65 (1.20-2.29) × 10 <sup>-4</sup>	100.0 ± 0.0	7
	E	1.77 (1.41-2.23) × 10 <sup>-4</sup>	88.6 ± 5.3	
FENTOLAMINA 10 <sup>-6</sup> M	C	1.86 (1.54-2.23) × 10 <sup>-4</sup>	100.0 ± 0.0	16
	E	1.90 (1.44-2.51) × 10 <sup>-4</sup>	96.6 ± 5.8	
COCAINA 10 <sup>-6</sup> M	C	1.94 (1.54-2.46) × 10 <sup>-4</sup>	100.0 ± 0.0	11
	E	1.83 (1.39-2.40) × 10 <sup>-4</sup>	100.8 ± 11.3	
INDOMETACINA 10 <sup>-5</sup> M	C	1.32 (0.94-1.85) × 10 <sup>-4</sup>	100.0 ± 0.0	10
	E	3.21 (2.66-3.87) × 10 <sup>-4</sup> **	68.9 ± 5.1*	
DESENSIBILIZACION RECEPTORES P <sub>2</sub>	C	1.31 (1.04-1.65) × 10 <sup>-4</sup>	100.0 ± 0.0	12
	E	2.29 (1.81-2.88) × 10 <sup>-4</sup> *	77.8 ± 9.6*	

Tabla XXIII.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx</sub>, % respecto del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta (n) de ATP sobre arterias cerebrales desprovistas de tono activo, en situación control (C) y en presencia (E) de fentolamina, cocaína, indometacina y tras la "desensibilización de los receptores P<sub>2</sub>".

\*P < 0.05

\*\*P < 0.01

		ED <sub>50</sub> (M)	Emáx (%)	n
REPETICION	C	3.38 (1.86-6.16) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	3
	E	2.75 (1.65-4.57) × 10 <sup>-7</sup>	86.7 ± 7.7	
FENTOLAMINA 10 <sup>-6</sup> M	C	3.54 (2.69-4.67) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	9
	E	3.38 (2.57-4.46) × 10 <sup>-7</sup>	100.3 ± 5.9	
COCAINA 10 <sup>-6</sup> M	C	3.16 (1.91-5.25) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	5
	E	2.51 (1.66-8.71) × 10 <sup>-7</sup>	71.3 ± 7.9*	
METISERGIDA 10 <sup>-4</sup> M	C	3.71 (3.09-4.46) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	10
	E	3.98 (2.88-5.49) × 10 <sup>-7</sup>	107.4 ± 8.8	
INDOMETACINA 10 <sup>-5</sup> M	C	2.34 (1.86-2.95) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	6
	E	2.45 (1.86-3.23) × 10 <sup>-7</sup>	95.3 ± 9.7	
NICARDIPINA 10 <sup>-7</sup> M	C	3.71 (3.09-4.46) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	9
	E	4.57 (3.46-6.02) × 10 <sup>-7</sup>	51.5 ± 7.0**	
NICARDIPINA 10 <sup>-5</sup> M	C	3.80 (3.31-4.36) × 10 <sup>-7</sup>	100.0 ± 0.0	12
	E	6.91 (4.78-10.0) × 10 <sup>-7</sup> **	34.5 ± 4.5**	

Tabla XXIV.- Valores de dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) con sus límites de confianza (entre paréntesis), y efecto máximo (E<sub>máx.</sub> % respecto del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control ± EEM), obtenidos a partir de todas las curvas dosis-respuesta (n) de α,β-metilén ATP sobre arterias cerebrales desprovistas de tono activo, en situación control (C) y en presencia (E) de fentolamina, cocaína, metisergida, indometacina y nicardipina.

\*P < 0.05

\*\*P < 0.01

## 5.- DISCUSSION

### 5.1.- Consideraciones acerca de la metodología empleada.

La multiplicidad de procedimientos experimentales diseñados para registrar las respuestas motoras del músculo liso cerebrovascular, así como para medir el flujo sanguíneo cerebral, se sitúa en el origen de las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos por los diferentes grupos de trabajo. Es por ello necesario justificar el empleo de la metodología escogida para realizar el plan de trabajo propuesto en la presente Tesis Doctoral.

El animal empleado en nuestras investigaciones es la cabra. Las especiales características anatómicas y fisiológicas de su circulación cerebral, junto con su natural docilidad, la convierten en el animal experimental adecuado para el registro del flujo sanguíneo cerebral en estado consciente. Las técnicas disponibles para registrar el flujo sanguíneo cerebral son muy numerosas. Las ventajas y desventajas de cada una de ellas han sido objeto de una detallada discusión (Edvinsson y Mackenzie, 1977). En este trabajo se ha empleado el método de la fluximetría electromagnética. La implantación de un fluxímetro perivascular en la arteria maxilar interna permite el registro, latido a latido, del flujo sanguíneo de dicha arteria, el cual coincide con el flujo sanguíneo total del hemisferio cerebral ipsilateral cuando se aíslan las circulaciones intra y extracraneal (Reimann et al., 1972).

Frente a los modelos "in vivo", los modelos "in vitro" permiten una evaluación más precisa de las respuestas motoras, así como una identificación más detallada de los receptores que median dichas respuestas. Existen varias formas de preparar las arterias cerebrales "in vitro". La más ampliamente empleada consiste en la obtención de segmentos cilíndricos, cuyo tono se registra a partir de dos soportes metálicos introducidos en la luz vascular, uno de los cuales se conecta con el dispositivo (transductor) que registra la

tensión (Nielsen y Owman, 1971). Esta preparación ha sido considerada la más "fisiológica", ya que las fibras musculares lisas de la pared arterial se orientan circularmente, desarrollándose la tensión a lo largo del eje mayor de dichas fibras (Nakayama, 1988). Para evitar en lo posible la disparidad entre los resultados obtenidos "in vivo" e "in vitro", se han utilizados arterias cerebrales medias de cabra en nuestros experimentos "in vitro".

### 5.2.- Efecto de los agonistas purinérgicos naturales sobre la circulación cerebral.

La primera evidencia experimental puesta de manifiesto en este trabajo ha sido el incremento del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la inyección de pequeñas cantidades de adenosina y sus nucleótidos, directamente en la circulación cerebral de la cabra sin anestésiar. La ausencia de cambios concomitantes en presión arterial, frecuencia cardíaca, pH, PaCO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub>, demuestra que este efecto vasodilatador cerebral se produce como consecuencia de la acción directa sobre los vasos cerebrales. Un análisis detallado de la bibliografía disponible revela la disparidad de los resultados existentes sobre este punto. Mientras que algunos investigadores detectan una ausencia casi absoluta de modificaciones en el flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la adenosina (Buyniski y Rapela, 1969; Berne et al., 1974; Heistad et al., 1981; Boarini et al., 1984), otros registran un claro efecto vasodilatador cerebral (Kozniewska et al., 1975; Forrester et al., 1979; Heistad et al., 1981; Sollevi et al., 1987).

Desde un punto de vista cuantitativo, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros investigadores no resulta sencilla, ya que la forma de administración de los fármacos adoptada en este trabajo no se corresponde con la establecida en otras investigaciones. Habitualmente se ha administrado el agonista en forma de infusión conti-

nua, en contraposición a la administración en forma de "bolos" seguida por nosotros. Nuestro modelo "in vivo" permite evaluar el efecto de pequeñas dosis de diferentes fármacos, aunque su duración sea de unos pocos segundos. Como los efectos suelen ser transitorios, una dosis puede repetirse cuantas veces se desee, pasando, si procede, a administrar dosis mayores, con lo cual se pueden elaborar verdaderas curvas dosis-respuesta "in vivo", teniendo como única limitación la aparición de alteraciones sistémicas. Con otras preparaciones experimentales, el tiempo del que se dispone para registrar el flujo sanguíneo cerebral es de unos pocos minutos, y por tanto es imprescindible que el fármaco a investigar se administre de forma que su efecto se manifieste durante un período de tiempo más prolongado para que pueda ser registrado. Por este motivo, se ha optado por la infusión continua. Las tasas de infusión oscilan entre 3 y 30  $\mu\text{g}/\text{min}$  de adenosina, registrándose incrementos del flujo sanguíneo cerebral del 20 al 80% (Kozniewska et al., 1975, Forrester et al., 1979; Heistad et al., 1981; Sollevi et al., 1987). En este rango de dosis, la adenosina incrementa el flujo sanguíneo cerebral en nuestras investigaciones entre un 24 y un 57%.

Para comprender mejor la capacidad de los agonistas purinérgicos para influenciar el flujo sanguíneo cerebral cuando se administran por vía intraluminal, es conveniente mencionar las investigaciones acerca de la captación de dichos compuestos por los vasos cerebrales.

Existen evidencias de que la adenosina atraviesa la barrera hematoencefálica, pudiendo acceder a la pared vascular e influir en su estado funcional. En estudios "in vivo" se ha demostrado que la adenosina cruza la barrera hematoencefálica por un sistema de captación de alta afinidad mediado por un transportador (Cornford y Oldendorf, 1975). Estudios "in vitro" han confirmado este hecho, ya que la adenosina es captada por las células endoteliales cere-

brales en cultivo (Beck et al., 1983) y por capilares cerebrales aislados (Wu y Phillis, 1982). La densidad del transportador de nucleósidos es cuatro veces superior en los capilares que en los vasos piales, lo cual resulta coherente con la función de cada uno de estos tramos vasculares: mientras que los primeros resultan de primera importancia en las funciones de transporte de la barrera hematoencefálica, los segundos están más involucrados en la regulación de la circulación cerebral (Kalaria y Harik, 1988).

Ahora bien, existen dos factores que actúan en sentido contrario y que pueden limitar este acceso: la capacidad metabólica de los eritrocitos y de las células endoteliales.

Está demostrado que la adenosina se metaboliza en la sangre rápidamente. Concretamente, en la sangre humana más del 50% de la adenosina (10  $\mu$ M) desaparece en tan sólo 15 segundos, y en 1 minuto desaparece completamente. La maquinaria enzimática responsable de esta metabolización se concentra en los eritrocitos (Dawicki et al., 1988). Aunque no existen estudios semejantes realizados en sangre de cabra, no parece aventurado aceptar que los eritrocitos de esta especie cuentan con la capacidad para metabolizar la adenosina. Si los tiempos de metabolización son semejantes a los registrados para la sangre humana, lo más probable es que la interacción de la adenosina con la pared vascular sea anterior a su metabolización, ya que, en nuestros experimentos, la vasodilatación cerebral empieza a manifestarse coincidiendo con el final de la inyección. No obstante, la posibilidad de que parte de la adenosina administrada resulte inactivada no puede ser descartada.

Aun aceptando que la adenosina pueda acceder a la pared vascular cerebral antes de ser metabolizada en la sangre, se presenta un segundo obstáculo que impide el transporte libre de adenosina desde la sangre al cerebro, y es la dotación enzimática contenida en las células endoteliales, la cual

incluye al enzima adenosina desaminasa, que exhibe un nivel de actividad semejante al registrado en corazón (Mistry y Drummond, 1986).

Al contrario de lo que sucede con la adenosina, los nucleótidos de la adenina (AMP, ADP y ATP) no cruzan la barrera hematoencefálica (Cornford y Oldendorf, 1975). Para comprender cómo estos compuestos pueden alterar el flujo sanguíneo cerebral cuando se administran intravascularmente, es necesario hacer referencia a los receptores endoteliales.

Furchgott y Zawadzki (1980a) demostraron que la relajación producida por la acetilcolina en aorta de conejo aislada era estrictamente dependiente de la presencia de células endoteliales. Desde entonces, una larga lista de sustancias han manifestado esta dependencia del endotelio para desencadenar la relajación, entre ellas el ATP. Esta evidencia se obtuvo simultáneamente en la arteria femoral de perro (De Mey y Vanhoutte, 1981) y en la aorta de conejo (Furchgott y Zawadzki, 1980b), ya que, en ambos casos, las relajaciones producidas por ATP y ADP fueron reducidas tras la eliminación, por abrasión, del endotelio. Por el contrario, la respuesta relajante de la adenosina no se modifica tras la eliminación del endotelio en un gran número de arterias y venas (véase Burnstock y Kennedy, 1985b), lo cual indica que su lugar de actuación es el músculo liso vascular. La capacidad del ATP y del resto de nucleótidos para incrementar el flujo sanguíneo cerebral cuando se administran intravascularmente en la circulación cerebral de la cabra podría explicarse, por lo tanto, por su interacción con el endotelio cerebrovascular, tal y como se ha observado en arterias cerebrales aisladas de otras especies (Hardebo et al., 1987).

Las investigaciones en las que se ha combinado la abrasión del endotelio con los métodos para la identificación farmacológica de los receptores purinérgicos, indican

la presencia de receptores  $P_1$  en las fibras musculares lisas y receptores  $P_2$  en las células endoteliales (Burnstock y Kennedy, 1985b). Aunque esta distribución de los receptores purinérgicos parece la más documentada, algunos resultados aportan soluciones intermedias. En la aorta porcina, una gran parte de la relajación producida por adenosina y AMP resulta abolida tras la abrasión del endotelio (Gordon y Martin, 1983). En la arteria central de la oreja de conejo, la respuesta relajante endotelio-dependiente al ATP se antagoniza con 8-fenilteofilina (Kennedy y Burnstock, 1985). Estos resultados demuestran la existencia, en algunos vasos sanguíneos, de receptores  $P_1$  endoteliales, con los cuales podría interaccionar el ATP, posiblemente de manera indirecta tras su degradación a adenosina.

Por lo que respecta a la potencia relativa entre agonistas, nuestros resultados obtenidos "in vivo" demuestran que el ATP es un vasodilatador más potente que los otros tres agonistas, adenosina, AMP y ADP, no existiendo diferencias significativas entre estos últimos. Un resultado semejante se ha obtenido en mandriles (Forrester et al., 1979) y en perros (Kozniowska et al., 1975), aunque las condiciones experimentales difieren de las establecidas por nosotros en varios aspectos: en primer lugar, los dos trabajos mencionados se han realizado en animales anestesiados; en segundo lugar, en ninguno de estos dos trabajos se investiga el efecto de los cuatro agonistas, estableciéndose la mayor potencia del ATP frente a la adenosina de forma puramente estimativa. En este sentido, puede afirmarse que nuestras investigaciones son más completas, ya que los resultados, obtenidos en condiciones fisiológicas (animal despierto), quedan avalados por un riguroso análisis estadístico.

A partir de estos resultados, y de acuerdo con los criterios establecidos para la clasificación de receptores purinérgicos (Burnstock, 1978), pueden extraerse dos conclusiones que, a falta de considerar los resultados obteni-

dos "in vitro" y con antagonistas, deben ser juzgadas como provisionales: 1) existen receptores purinérgicos P<sub>2</sub> en el lecho vascular cerebral, ya que el ATP es el agonista más potente, y 2) los agonistas AMP y ADP ejercen su efecto tras la hidrólisis a adenosina, ya que los tres agonistas son equipotentes; posiblemente, el receptor es el mismo para dichos agonistas (P<sub>1</sub>) y diferente del correspondiente a ATP (P<sub>2</sub>), ubicándose en el músculo liso y en el endotelio cerebrovasculares, respectivamente.

En nuestros experimentos, el efecto "in vitro" de los agonistas purinérgicos depende fundamentalmente de la existencia previa de tono activo. En ausencia de dicho tono, adenosina y AMP no manifiestan ningún efecto apreciable, mientras que ADP y ATP desencadenan una respuesta contráctil a las dosis más elevadas. Cuando se induce el tono activo, los cuatro agonistas originan relajación vascular, aunque ADP y ATP producen, a las dosis más elevadas, una contracción transitoria previa a dicha relajación.

Todas las investigaciones previas sobre este punto se han llevado a cabo únicamente en segmentos arteriales precontraídos. Los resultados son ampliamente coincidentes, habiéndose registrado en todos los casos un efecto relajante de la adenosina y sus nucleótidos. No existe la misma homogeneidad, sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo. Los valores de ED<sub>50</sub> para la adenosina varían desde un valor máximo de  $1.34 \times 10^{-4} \text{M}$  en arterias cerebrales medias de perro (Urquilla et al., 1976), hasta un valor mínimo de  $4 \times 10^{-7} \text{M}$  en arterias cerebrales medias de gato (Hardebo y Edvinsson, 1979). Estas diferencias no deben ser atribuidas a la especie animal investigada, ya que, en este último tejido, se han registrado valores entre 1 y  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  (Hardebo et al., 1987; Edvinsson y Fredholm, 1983) y algo mayores (aproximadamente  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) (Salaíces et al., 1985). El valor obtenido en nuestro trabajo es aproximadamente de  $4 \times 10^{-6} \text{M}$ , valor prácticamente idéntico al registrado en arterias basi-

lares porcinas (McBean et al., 1988). Por lo que respecta a la actividad intrínseca (efecto máximo), los resultados también muestran una gran variabilidad, estableciéndose un rango entre el 50% (porcentaje del tono activo) obtenido en arteria cerebral media de gato (Hardebo y Edvinsson, 1979), y el 150% en arteria basilar porcina (McBean et al., 1988). En nuestras investigaciones este parámetro alcanza un valor aproximado del 66%.

El orden de potencia entre agonistas, estimado con los valores de ED<sub>50</sub>, presenta ligeras variaciones entre las diferentes investigaciones, pero resulta coincidente en una conclusión común: el ATP es más potente que la adenosina relajando las arterias cerebrales. Los análisis estadísticos aplicados a nuestros resultados apoyan esta conclusión, y también ponen de manifiesto que la potencia de adenosina es la misma que la de AMP, siendo la de ambos inferior a la de ADP y ATP. Este hecho es compatible con la existencia de receptores P<sub>2</sub> en las arterias cerebrales (Burnstock, 1978), apoyando la conclusión que se había adelantado anteriormente.

Una de las observaciones más interesantes realizadas en los experimentos "in vitro" la constituye el efecto dual del ATP (contracción-relajación). Este doble efecto ha sido registrado en una amplia variedad de tejidos y lechos vasculares (Burnstock y Brown, 1981; Su, 1981), aunque su fundamento no ha empezado a ser conocido hasta que se han iniciado las investigaciones acerca de la heterogeneidad de los receptores P<sub>2</sub>.

Actualmente se postula la existencia de, al menos, dos subtipos de receptores P<sub>2</sub>: P<sub>2x</sub>, cuya activación produce contracción, y P<sub>2y</sub>, cuya activación produce relajación (Burnstock y Kennedy, 1985a). Puesto que la identificación de ambos tipos de receptores se basa en la potencia relativa entre una serie de derivados sintéticos del ATP (entre ellos

$\alpha,\beta$ -mATP), las conclusiones de nuestros experimentos en este apartado se extraerán más adelante al comentar los resultados obtenidos con este derivado.

### 5.3.- Efecto de los agonistas purinérgicos sintéticos sobre la circulación cerebral.

Los estudios "in vitro" con agonistas sintéticos de la adenosina son muy abundantes, y de ellos ha surgido la clasificación de los receptores para este nucleósido. No ocurre lo mismo con los estudios "in vivo", sobre todo en lo referente a su efecto sobre la circulación.

La adenosina y sus derivados sintéticos ejercen efectos sedantes, hipotérmicos y anticonvulsivos cuando se administran intraperitonealmente (Jonzon et al., 1986) o por vía intravenosa (Jonzon et al., 1986; Popoli et al., 1988), lo cual sugiere que el sistema purinérgico desempeña un papel importante en la excitabilidad del sistema nervioso central. La administración intravenosa de NECA provoca una hipotensión mayor que la causada por adenosina (Phillis y Wu, 1983; Jonzon et al., 1986). La inyección de 2-ClAD en la aurícula izquierda del perro anestesiado incrementa el flujo sanguíneo coronario en mayor medida que la adenosina (Angus et al., 1971). Ambos derivados (NECA y 2-ClAD) incrementan marcadamente el flujo de las arteriolas submucosas del intestino de rata cuando se aplican tópicamente en la serosa (Proctor, 1987).

Por lo que respecta a la circulación cerebral, nuestro trabajo constituye el primer estudio sistemático acerca de los efectos de los derivados sintéticos de la adenosina sobre el flujo sanguíneo cerebral.

Nuestros resultados obtenidos "in vivo" demuestran que el derivado 2-ClAD es un vasodilatador más potente que la adenosina, lo cual confirma las conclusiones de los es-

tudios de estructura-actividad, los cuales indican que la adición de un radical 2-cloro incrementa la potencia de la adenosina (Paton, 1981). En cuanto al derivado NECA, aunque su función dosis-respuesta se sitúa por encima de la de adenosina (su intersección en el origen es significativamente mayor), no puede afirmarse que su potencia sea superior en todo el rango de dosis investigado, ya que, por ser ambas funciones convergentes hacia la derecha (la pendiente de adenosina es superior), sus efectos tenderán a ser más semejantes a las dosis más elevadas. Por su parte, el derivado L-PIA exhibe una función dosis-respuesta inferior a la de los dos agonistas mencionados, con lo cual el orden de potencia entre los tres queda como sigue: 2-ClAD>NECA>L-PIA. Según el criterio aceptado para clasificar los receptores de adenosina (Burnstock, 1984; Daly, 1985; Williams, 1987), esta secuencia es compatible con la existencia de receptores A<sub>2</sub>, ya que el derivado L-PIA es el agonista menos potente de los tres. El hecho de que este derivado sea más potente que el estereoisómero D-PIA, pone de manifiesto la estereoselectividad de este tipo de receptor.

La conclusión de que el receptor que media el efecto vasodilatador cerebral de la adenosina corresponde al subtipo A<sub>2</sub>, se desprende igualmente de los resultados obtenidos "in vitro", si bien el orden de potencia entre los dos agonistas más potentes, 2-ClAD y NECA, resulta invertido. El orden de potencia obtenido es el siguiente: NECA>2-ClAD>L-PIA, en concordancia con los resultados obtenidos en arteria basilar de conejo, arteria temporal pial humana (Hardebo et al., 1987), arteria cerebral media de gato (Edvinsson y Fredholm, 1983; Hardebo et al., 1987) y arteria basilar porcina (McBean et al., 1988). Menos homogéneos son los resultados obtenidos con los isómeros L- y D-PIA. En nuestras investigaciones, ambos agonistas resultan ser equipotentes, y por tanto no es posible atribuir a los receptores A<sub>2</sub> identificados "in vitro" la propiedad de la estereoselectividad puesta de manifiesto "in vivo". Como precedente

de este tipo de experimento sólo puede citarse el trabajo de Hardebo y colaboradores (1987) en arteria cerebral media de gato y en arteria pial humana, en el que se registra una potencia vasodilatadora para el derivado L-PIA superior a la de D-PIA.

Los resultados obtenidos con el derivado de degradación lenta,  $\alpha,\beta$ -mATP, merecen discusión aparte.

Una de las cuestiones que siempre se ha suscitado al interpretar los resultados recogidos en las investigaciones con ATP, es si este nucleótido actúa "per se" o indirectamente tras su hidrólisis a adenosina. Para resolver el problema se han sintetizado una serie de derivados estables del ATP, entre los que se encuentra el  $\alpha,\beta$ -mATP. Básicamente, la síntesis consiste en el remplazamiento isostérico del oxígeno anhídrido que une los átomos  $\alpha$  y  $\beta$ , por un grupo metilén. El efecto inhibitor de este derivado sobre la taenia coli de cobaya no se potencia en presencia de dipiridamol, un potente inhibidor del transporte de adenosina, lo cual demuestra que el  $\alpha,\beta$ -mATP no sufre la degradación a adenosina (Maguire y Satchell, 1979). En virtud de esta característica, el criterio que se ha seguido para discernir las acciones del ATP es el siguiente: si el  $\alpha,\beta$ -mATP reproduce los efectos de ATP, éstos se manifiestan como consecuencia de la acción del ATP como tal, mientras que si ambos agonistas tienen efectos opuestos, los del ATP pueden ser atribuidos en realidad a la adenosina que se produce tras su hidrólisis (Maguire y Satchell, 1979; Ribeiro y Lima, 1985).

En nuestros experimentos "in vivo", el  $\alpha,\beta$ -mATP, al contrario que ATP y el resto de agonistas, reduce el flujo sanguíneo cerebral. Aunque no existen estudios semejantes realizados por otros investigadores, esta acción vasoconstrictora es compatible con el efecto presor que manifiesta este compuesto cuando se administra intravascularmente en ratas (Delbro et al., 1985; Bulloch y McGrath, 1988) y

gatos (Ribeiro y Lima, 1985). Según estos resultados, y en función del criterio mencionado anteriormente, podría sugerirse que el ATP desarrolla su efecto vasodilatador cerebral "in vivo" tras la hidrólisis a adenosina. No obstante, el hecho ya comentado de que el ATP es un vasodilatador más potente que la adenosina no sustenta esta suposición, ya que, si existiera tal efecto indirecto, el nucleótido tendría que ser igual o menos potente que el nucleósido, pero no más (Burnstock, 1984). Un argumento adicional (y posiblemente el más importante) en contra del efecto indirecto del ATP, lo constituye el hecho de que su efecto se bloquea en menor medida que la adenosina con el antagonista 8-fenilteofilina, aunque este punto será objeto de discusión más adelante. Por último, tampoco puede descartarse que el  $\alpha, \beta$ -mATP actúe por sí mismo de forma diferente al ATP, con lo cual este compuesto no sería un buen indicador de las acciones del ATP (Ribeiro y Lima, 1985).

En contraste con las investigaciones "in vivo", los estudios "in vitro" con  $\alpha, \beta$ -mATP son numerosos, habiéndose empleado en la mayoría de ellos para establecer la participación del ATP en la neurotransmisión simpática. Nuestros resultados "in vitro" demuestran que el  $\alpha, \beta$ -mATP contrae las arterias cerebrales estén o no sometidas a tono activo previo. La curva dosis-respuesta para este agonista se sitúa a la izquierda de la de ATP, ambas obtenidas en tensión basal, lo cual pone de manifiesto la mayor potencia contráctil del derivado. En virtud del criterio de la potencia relativa para la identificación de receptores  $P_2$  (Burnstock y Kennedy, 1985a), puede concluirse la existencia de receptores  $P_{2x}$  en las arterias cerebrales, cuyo agonista más potente produciendo vasoconstricción es el  $\alpha, \beta$ -mATP. Por exclusión, debe existir un receptor diferente sobre el cual actúa el ATP para producir vasodilatación, y que correspondería al subtipo  $P_{2y}$ .

Estudios previos realizados en otros lechos vasculares en los que se llega a una conclusión semejante, indican que los receptores  $P_{2x}$  están localizados en el músculo liso vascular, mientras que los receptores  $P_{2y}$  lo están en el endotelio (véase Burnstock y Kennedy, 1985a). Una distribución semejante en las arterias cerebrales podría explicar el efecto dual del ATP registrado "in vitro": puesto que el ATP interacciona en primer lugar con el músculo liso dada la disposición del cilindro vascular, el primer componente de la respuesta sería siempre la contracción y el segundo la relajación, lo cual se ajusta estrechamente a la observación experimental realizada. También quedaría explicada la capacidad del ATP para incrementar el flujo sanguíneo cerebral cuando se administra por vía intraarterial, a pesar de que no cruza la barrera hematoencefálica. Dicho efecto estaría mediado por receptores  $P_2$  correspondientes al subtipo  $P_{2y}$ .

#### 5.4.- Efectos de los antagonistas de los receptores purinérgicos.

##### 5.4.1.- Receptores $P_1$ .

El interés por investigar el papel de la adenosina como neuromodulador en el SNC surgió al constatarse su capacidad para estimular la actividad adenilato ciclasa en el cerebro. Aún resultó más importante, sin embargo, la observación experimental de que las metilxantinas, especialmente la cafeína y la teofilina, empleadas tradicionalmente como inhibidores de la fosfodiesterasa, bloqueaban las acciones de la adenosina sobre la formación de AMPc en lugar de potenciarlas, como era de esperar. Esta evidencia fue la que condujo a la hipótesis de que las metilxantinas son antagonistas de la adenosina (Williams, 1987).

Las acciones farmacológicas de las metilxantinas son numerosas. Tras la administración de estas sustancias se evidencia broncodilatación, diuresis, taquicardia, insomnio,

ansiedad, arritmia cardíaca y respiratoria, etc. (Rall, 1986). El mecanismo de acción no se conoce con exactitud, barajándose actualmente varias hipótesis. Una de ellas propone que las acciones farmacológicas de las metilxantinas se deben a su capacidad para inhibir la fosfodiesterasa; otra mantiene que el mecanismo responsable es su influencia sobre el transporte de calcio; por último, se esgrime su cualidad como antagonista de los receptores benzodiazepínicos. No obstante, la hipótesis según la cual las acciones farmacológicas de las xantinas se basan en su propiedad para antagonizar los receptores de la adenosina, es la que cuenta actualmente con mayor solidez (Bruns, 1988).

Los efectos de las metilxantinas sobre la circulación cerebral han sido objeto de investigación por parte de numerosos investigadores. La respuesta del flujo sanguíneo cerebral a la teofilina registrada por los diferentes grupos reviste una gran variabilidad, atribuible a la especie investigada, la metodología empleada y la dosis y vía de administración escogidas. Así, la infusión intraarterial de teofilina no tiene ningún efecto sobre el flujo sanguíneo cerebral en el perro durante normoxia (Emerson y Raymond, 1981); sin embargo, reduce la resistencia vascular cerebral en el cerebro perfundido de esta especie animal (Oberdörster et al., 1975). La infusión intravenosa de teofilina disminuye el flujo sanguíneo cerebral basal en humanos, y la misma respuesta se obtiene tras la inyección intraarterial de aminofilina (Gottstein y Paulson, 1972; Magnussen y Hoedt-Rasmussen, 1977). En ratas, la administración intraperitoneal de dosis bajas (1.6-50  $\mu\text{mol/kg}$ ) de teofilina disminuye el flujo sanguíneo cerebral (Grome y Stefanovich, 1986; Morii et al., 1987), mientras que a dosis altas (200  $\mu\text{mol/kg}$ ) lo incrementa (Morii et al., 1987).

En nuestros experimentos, la respuesta de la circulación cerebral a la teofilina depende fundamentalmente de la forma de administración, así como de la dosis. La inyección

de 1 mg en forma de bolo único incrementa el flujo sanguíneo cerebral en un 40%. Sin embargo, cuando se administra a dosis total de 1 mg/min (0.15  $\mu$ mol/kgxmin) no se registra ninguna alteración de dicho parámetro. Basta incrementar la tasa de infusión a 2 mg/min (0.30  $\mu$ mol/kgxmin) para que el flujo sanguíneo cerebral experimente un incremento significativo que permanece mientras dura la infusión.

En comparación con el rango de dosis empleado por otros investigadores, las dosis empleadas en nuestros experimentos pueden considerarse bajas, poniéndose de manifiesto la contradicción entre nuestros resultados (no efecto o vasodilatación) y los que muestran una clara reducción de flujo sanguíneo cerebral con dosis incluso superiores a las empleadas por nosotros (Gottstein y Paulson, 1972; Grome y Stefanovich, 1986; Morii et al., 1987). No obstante, estas dosis podrían ser relativamente altas en nuestras condiciones experimentales si se tiene en cuenta que se administran directamente en la circulación cerebral, con lo cual se evita la dispersión en la circulación general antes de alcanzar el territorio vascular cerebral. Desde esta perspectiva, nuestros resultados podrían considerarse coincidentes con aquellos que evidencian un efecto vasodilatador cerebral de teofilina a dosis altas (Oberdörster et al., 1975; Morii et al., 1987).

El efecto vasodilatador cerebral registrado para la teofilina en nuestros experimentos no puede ser atribuido al antagonismo de los receptores de la adenosina. De hecho, el efecto previsible en caso de que tal interacción tuviera lugar sería justo el opuesto, la vasoconstricción cerebral, puesto que estos receptores median vasodilatación cerebral. Más probable resulta la hipótesis de que la teofilina debe su efecto a su capacidad para inhibir la fosfodiesterasa e influir en el transporte de calcio, acciones ambas susceptibles de inducir vasodilatación (Burnstock, 1978).

Por lo que respecta al otro antagonista de los receptores  $P_1$  empleado en este trabajo, 8-fenilteofilina, las evidencias experimentales demuestran que es más potente que la teofilina como antagonista de dichos receptores (Griffith et al., 1981; Fredholm y Persson, 1982), propiedad a la que hay que añadir su menor actividad como inhibidor de la fosfodiesterasa (Griffith et al., 1981), lo cual la convierte en un antagonista de los receptores  $P_1$  preferible a la teofilina. Además, nuestros resultados demuestran la selectividad de este antagonista por los receptores de la adenosina, ya que otros vasodilatadores de la circulación cerebral, como acetilcolina e histamina, no ven modificado su efecto en presencia de 8-fenilteofilina.

Hasta ahora, y por lo que respecta a la circulación cerebral, el uso de 8-fenilteofilina se ha visto limitado a los estudios "in vitro", en los cuales se ha administrado a dosis que no tienen efecto "per se" sobre la tensión de las arterias cerebrales precontraídas. Nuestros resultados "in vivo" demuestran que la infusión continua de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina directamente en la circulación cerebral, no tiene ningún efecto apreciable sobre el flujo sanguíneo cerebral y el resto de parámetros registrados. "In vitro", este antagonista exhibe su umbral de relajación a dosis de  $3 \times 10^{-7}$ - $10^{-6}\text{M}$ , en concordancia con lo registrado por otros investigadores (Edvinsson y Fredholm, 1983; McBean et al., 1988). La relajación que se evidencia a dosis superiores puede atribuirse, como en el caso de la teofilina, a la inhibición de la fosfodiesterasa.

En nuestros experimentos, tanto teofilina como 8-fenilteofilina reducen significativamente la vasodilatación cerebral inducida por adenosina. Comparativamente, el derivado 8-fenil se muestra más potente que la propia teofilina, ya que mientras que la infusión continua de 1  $\text{mg}/\text{min}$  de este último antagonista reduce el efecto vasodilatador de la dosis de 30  $\mu\text{g}$  de adenosina en un 24% aproximadamente, la

infusión continua de 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  de 8-fenilteofilina lo hace en un 36%, lo cual confirma resultados previos acerca del mayor poder inhibitor del derivado 8-fenil sobre las respuestas de tipo  $P_1$ , en otros tejidos (Griffith et al., 1981; Fredholm y Persson, 1982).

Las referencias sobre el antagonismo adenosina-metilxantinas "in vivo" son realmente escasas. Pueden citarse dos trabajos, ambos realizados en condiciones experimentales muy distintas a las fijadas por nosotros. En uno de ellos se da cuenta de la inhibición del aumento del calibre de las arterias piales de perro inducido por la aplicación tópica de adenosina, en presencia de teofilina (Wahl y Kuschinsky, 1976). En el otro se evidencia que, durante la infusión de adenosina en el cerebro de perro perfundido, la cual reduce la resistencia vascular cerebral, la teofilina incrementa este parámetro (Oberdörster et al., 1975). A pesar de las grandes diferencias metodológicas, la principal conclusión de estas investigaciones coincide básicamente con la obtenida por nosotros, poniéndose de manifiesto la capacidad de las metilxantinas para inhibir la respuesta vasodilatadora cerebral a la adenosina. De acuerdo con uno de los principales criterios para la identificación de los receptores purinérgicos (Burnstock, 1978), puede concluirse la existencia de receptores purinérgicos  $P_1$  en la circulación cerebral.

Los estudios de interacción agonistas purinérgicos-metilxantinas se extendieron al resto de derivados naturales de adenosina: AMP, ADP y ATP. El efecto de estos nucleótidos resultó ser sensible al bloqueo con 8-fenilteofilina, pero no en igual medida que el de adenosina. El análisis estadístico reveló la menor sensibilidad del ATP frente al bloqueo con 8-fenilteofilina, siendo la de AMP igual a la de adenosina y la de ADP intermedia entre la de éstos y la de ATP. Si a esto añadimos que la potencia vasodilatadora de ATP, como ya se ha mencionado, es superior a la del resto de

agonistas, se cuenta con las evidencias suficientes para establecer la existencia de receptores separados para adenosina ( $P_1$ ) y ATP ( $P_2$ ). No obstante, una parte del efecto de ATP debe ser atribuída a su interacción con receptores  $P_1$ , posiblemente tras la hidrólisis a adenosina, tal y como se ha propuesto en otros lechos vasculares (Sollevi et al., 1984; Ribeiro y Lima, 1985; Kennedy y Burnstock, 1985). Siguiendo estos criterios puede aceptarse igualmente que ADP y, sobre todo, AMP, actúan sobre receptores  $P_1$ .

En nuestros experimentos "in vitro", el antagonista 8-fenilteofilina no modifica la respuesta relajante inducida por adenosina y ATP, expresada ésta en función de los valores de  $ED_{50}$ . El análisis de la literatura existente sobre este punto demuestra que este resultado, en contra de lo que pudiera parecer, no es excepcional. Se ha evidenciado que 8-fenilteofilina desplaza a la derecha la curva dosis-respuesta de relajación de la adenosina, obtenida en arterias cerebrales de gato (Edvinsson y Fredholm, 1983), pero también existen referencias negando esta relación de antagonismo entre ambas substancias, obtenidos en arterias cerebrales porcinas (McBean et al., 1988). Como resultado intermedio, se ha afirmado que 8-fenilteofilina bloquea únicamente el efecto de las dosis bajas de adenosina, en arterias cerebrales humanas (Hardebo et al., 1987).

Las explicaciones a los resultados negativos sobre el antagonismo 8-fenilteofilina-adenosina son variadas y, hasta cierto punto, especulativas. Entre ellas, y en virtud de nuestros resultados "in vivo" y los obtenidos por otros investigadores, puede descartarse la no existencia de receptores  $P_1$ . La justificación podría tener varias vertientes. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la adenosina puede actuar sobre receptores de superficie (genéricamente R) y sobre un receptor localizado intracelularmente (P) (Londos y Wolff, 1977). Las metilxantinas, por su parte, son antagonistas de los receptores R. Si la adenosina actuara

fundamentalmente sobre el receptor P intracelular, tal y como lo hace en la aorta (Collis y Brown, 1983), el antagonista sería incapaz de antagonizar la respuesta. Otra explicación podría ser la existencia de otro subtipo de receptor para la adenosina, hipótesis apuntada en función de una doble evidencia experimental: la incapacidad de 8-fenilteofilina para inhibir la respuesta a adenosina, y el perfil de la función dosis-respuesta de NECA, distinto al del resto de agonistas (McBean et al., 1988). Por último, puede darse una explicación más sencilla, y es la imposibilidad de incrementar la dosis de 8-fenilteofilina, la cual muestra, a dosis elevadas, efecto "per se" sobre los vasos cerebrales. Si a esto se añade la baja afinidad del antagonista por los receptores A<sub>2</sub> (Edvinsson y Fredholm, 1983; Collis et al., 1985), se comprenderá que, a dosis lo suficientemente bajas para que no tenga efecto "per se", pueda no ejercer ningún efecto inhibitorio.

Una de las cuestiones más debatidas, directamente ligada a los estudios sobre el efecto "per se" de las metilxantinas, es la posible participación de la adenosina en el mantenimiento del tono vascular cerebral, en condiciones basales. Actualmente, pocas dudas existen de que la adenosina interviene en el acoplamiento flujo sanguíneo-metabolismo en el cerebro, durante hipoxia. A esta conclusión han contribuido decisivamente los estudios con metilxantinas. De hecho, tanto la teofilina como la cafeína, antagonistas de la adenosina, atenúan el incremento de flujo sanguíneo cerebral inducido por un episodio de anoxia (Emerson y Raymond, 1981; Phillis et al., 1984), lo cual puede significar que este incremento se debe a una sobreproducción de adenosina.

Por el contrario, un papel semejante de la adenosina en condiciones basales (normoxia) está aún por confirmar. La controversia acerca de esta participación es un fiel reflejo de la disparidad entre los resultados sobre el efecto de las metilxantinas sobre el flujo sanguíneo cerebral. Es decir,

aquellos autores que registran disminución del flujo sanguíneo cerebral durante la administración de metilxantinas, sostienen que la adenosina interviene en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Grome y Stefanovich, 1986; Morii et al., 1987), mientras que los que no registran ningún efecto "per se" de las metilxantinas cuando se administran a dosis capaces de inhibir el efecto de la adenosina exógena, niegan dicha participación (Wahl y Kuschinsky, 1976; Phillis et al., 1984; Morii et al., 1985). Nuestros resultados se inscriben entre estos últimos. Si tal participación tuviera lugar, la infusión de 8-fenilteofilina a dosis capaces de bloquear el efecto de la adenosina exógena, debería reducir el flujo sanguíneo cerebral como consecuencia del bloqueo de la adenosina endógena. Puesto que esto no ocurre, la implicación de la adenosina en el mantenimiento del tono vascular cerebral en condiciones fisiológicas puede descartarse. Un estudio reciente sobre los niveles cerebrales basales de adenosina indica que son tan bajos (10-100 nM), que no resulta extraño que las metilxantinas no tengan efecto "per se" en varias preparaciones experimentales, aportando una evidencia más en contra del papel de la adenosina como factor controlador del tono vascular cerebral en condiciones basales (Phillis et al., 1987).

#### 5.4.2.- Receptores P<sub>2</sub>.

Como ya se ha mencionado anteriormente, no existen antagonistas selectivos de las respuestas inducidas por ATP. Entre los métodos más recientes propuestos para inhibir dichos respuestas hemos escogido el más difundido: la desensibilización de los receptores P<sub>2</sub> con el análogo lentamente degradable del ATP,  $\alpha,\beta$ -mATP (Kasakov y Burnstock, 1982). Gracias a esta técnica se ha ido consolidando la hipótesis de que el ATP se libera durante la neurotransmisión junto con la noradrenalina, y que este nucleótido es el responsable del componente contráctil resistente a los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, que se manifiesta con la estimulación

eléctrica de los nervios simpáticos que controlan diferentes tejidos (Meldrum y Burnstock, 1983; Sneddon y Westfall, 1984; Sneddon y Burnstock, 1984; Duval et al., 1985; Stjärne y Astrand, 1985; Kennedy et al., 1986; Vidal et al., 1986; Warland y Burnstock, 1987; Kasakov et al., 1988; Machaly et al., 1988).

Dado que, en nuestros experimentos, ambos agonistas tienen cualitativamente el mismo efecto (contracción) únicamente en arterias cerebrales desprovistas de tono activo, el método de la desensibilización se aplicó en esta situación. Nuestros resultados demuestran que la taquifilaxia al  $\alpha,\beta$ -mATP no anula la respuesta al ATP, pero la reduce significativamente. En un trabajo previo realizado igualmente sobre arterias cerebrales aisladas se produjo, al contrario de lo observado en nuestros experimentos, una taquifilaxia cruzada entre ambos agonistas, de forma que la respuesta a ATP quedó totalmente bloqueada tras la exposición repetida a  $\alpha,\beta$ -mATP (Hardebo et al., 1987). Nuestros resultados ponen de manifiesto, por tanto, que la respuesta contráctil a ATP no puede explicarse por su acción sobre el mismo tipo de receptor que media la respuesta contráctil a  $\alpha,\beta$ -mATP, y viceversa.

En otras investigaciones se cuestiona la idoneidad del método de la desensibilización. De hecho, en la arteria basilar de rata inmadura, la exposición repetida a  $\alpha,\beta$ -mATP afecta tanto a la respuesta frente a ATP, como a la respuesta frente a noradrenalina (Byrne y Large, 1986). En la arteria de la cola de ratas espontáneamente hipertensas, la respuesta vasoconstrictora a ATP resulta significativamente reducida, pero no completamente, tras el tratamiento con  $\alpha,\beta$ -mATP (Vidal et al., 1986). La respuesta evocada por el ATP exógeno en la taenia caeci de cobayo no se modifica en presencia de  $\alpha,\beta$ -mATP (Den Hertog et al., 1985), y lo mismo ocurre en el íleon de esta especie (Wiklund y Gustafsson, 1988). Podría sugerirse, por tanto, que ambos agonistas, ATP

y  $\alpha,\beta$ -mATP, lo son de receptores distintos. De hecho, se ha establecido recientemente una serie de criterios provisionales en base a los cuales podría identificarse un tercer subtipo de receptor, denominado por los autores  $P_{2S}$ , moderadamente susceptible a la desensibilización por el derivado  $\alpha,\beta$ -mATP (Wiklund y Gustafsson, 1988).

Nuestros resultados demuestran igualmente que ninguno de los dos agonistas actúa directamente sobre receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, ya que sus efectos no se modifican por fentolamina. Tampoco pueden considerarse sustancias que actúen como los fármacos simpaticomiméticos indirectos, puesto que la cocaína no modifica ninguna de las dos respuestas contráctiles. En el caso del  $\alpha,\beta$ -mATP, además, puede descartarse la interacción con receptores triptaminérgicos, puesto que la metisergida no modifica la respuesta a este derivado. Resultados similares se han obtenido en otros lechos vasculares tales como la arteria femoral de rata (Kennedy et al., 1985), así como en arterias cerebrales de otras especies (Hardebo et al., 1987)

La relación entre los agonistas purinérgicos y los movimientos de  $Ca^{2+}$  en el endotelio y el músculo liso vascular está siendo objeto de una amplia investigación actualmente. El mecanismo de acción propuesto para el ATP parece incluir los siguientes pasos: formación de inositol-1,4,5,-trifosfato, el cual actúa como movilizador de  $Ca^{2+}$ , aumentando la concentración citosólica y el flujo hacia el exterior de este ión. A su vez, se activan los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , incrementándose la permeabilidad a dicho ión (Pirrotton et al., 1987; Tawada et al., 1987; Sauve et al., 1988). En una de estas investigaciones se afirma que el derivado  $\alpha,\beta$ -mATP, al contrario que el ATP, no influye en los flujos de  $Ca^{2+}$  (Tawada et al., 1987). Nuestros resultados no parecen coincidir con esta aseveración, ya que el  $\alpha,\beta$ -mATP contrae las arterias cerebrales, siendo esta con-

tracción eficazmente inhibida por el fármaco bloqueador de la entrada de  $Ca^{2+}$ , nicardipina.

Desde que Needleman y colaboradores (1974) demostraron que ADP y ATP, pero no adenosina y AMP, estimulan la producción de prostaglandinas en diferentes tejidos, han proliferado las investigaciones para determinar si las acciones de ambos nucleótidos (sobre todo del ATP) están mediadas por este proceso. Muchas de ellas se han llevado a cabo en tejidos no vasculares, habiéndose registrado resultados contradictorios. Por ejemplo, la indometacina, inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, atenúa la relajación producida por ATP en tráquea de cobayo, así como la relajación de rebote inducida por este nucleótido en la taenia coli de esta especie animal, hallazgos ambos compatibles con la hipótesis de la mediación de las prostaglandinas en la respuesta a ATP (Brown y Burnstock, 1981). Por el contrario, la indometacina no modifica la respuesta contráctil al ATP del vas deferens y del íleon de cobayo (Fedan et al., 1982; Wiklund y Gustafsson, 1988).

Por lo que respecta a los vasos sanguíneos, actualmente se acepta que el ATP ejerce, al menos, dos acciones sobre las células endoteliales arteriales: induce la liberación del factor relajante de origen endotelial, un vasodilatador aún sin identificar, y de prostaciclina ( $PGI_2$ ), un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetar (Boeynaems et al., 1988). Esta prostaglandina se sintetiza en las arterias cerebrales a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclo-oxigenasa, pudiendo estar implicada en el mantenimiento del tono vascular cerebral (Pickard, 1981). Cabe la posibilidad, por tanto, de que la vasodilatación cerebral producida por el ATP esté mediada por la estimulación de la síntesis de  $PGI_2$  por encima de los niveles basales. Esta posibilidad se investigó registrando el efecto del ATP durante el tratamiento con indometacina.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con indometacina reduce el flujo sanguíneo cerebral e incrementa la resistencia vascular cerebral, resultado que coincide con el incremento de tensión vascular registrado en las arterias cerebrales aisladas. A pesar de que existen discrepancias a este respecto entre las diferentes investigaciones (atribuidas a cuestiones metodológicas), cuando se usa un método riguroso para la estimación del flujo sanguíneo y el metabolismo energético cerebral, se demuestra que la indometacina reduce el flujo sanguíneo cerebral sin que cambie el metabolismo energético. Por consiguiente, nuestros resultados son compatibles con la participación de la PGI<sub>2</sub> en el mantenimiento del tono vascular cerebral en condiciones basales.

Durante el tratamiento con indometacina, la respuesta relajante a ATP registrada tanto "in vivo" como "in vitro" no se modifica, aportando una evidencia en contra de la participación de las prostaglandinas vasodilatadoras en la respuesta de la circulación cerebral al ATP. Idéntico resultado se ha obtenido en arterias cerebrales aisladas de otras especies animales (Hardebo et al., 1987).

Por otra parte, en nuestros experimentos la indometacina bloquea la respuesta contráctil producida por ATP "in vitro", pero no la producida por  $\alpha,\beta$ -mATP. En contraposición, otros investigadores no encuentran ninguna modificación de la respuesta contráctil a ambos agonistas en las arterias cerebrales de otras especies animales (Hardebo et al., 1987). Nuestros resultados parecen confirmar, por tanto, que la conformación de la cadena polifosfato es crítica para la estimulación de la síntesis de prostaglandinas (Brown y Burnstock, 1981), y que estas sustancias pueden estar implicadas en la contracción inicial transitoria producida por el ATP en las arterias cerebrales aisladas. Además, aportan una nueva evidencia a favor del diferente mecanismo de actuación del ATP y de su derivado  $\alpha,\beta$ -mATP.

## **6.- CONCLUSIONES**

1.- La adenosina y sus derivados naturales (AMP, ADP y ATP) y sintéticos (2-ClAD, NECA, L- y D-PIA), actúan como vasodilatadores cerebrales por su acción directa sobre las arterias cerebrales. Por su parte, el análogo de degradación lenta,  $\alpha, \beta$ -mATP, actúa como vasoconstrictor cerebral igualmente por su acción directa sobre dichas arterias. Esta conclusión se justifica por la ausencia de cambios en parámetros hemodinámicos y metabólicos durante la vasodilatación obtenida cuando los mencionados agonistas se administran directamente en la circulación cerebral de la cabra sin anestesiar (experimentos "in vivo"), y por la sensibilidad de las arterias cerebrales aisladas frente a dichos agonistas (experimentos "in vitro").

2.- El efecto vasodilatador cerebral de la adenosina se desarrolla por su interacción con receptores específicos (receptores purinérgicos  $P_1$ ), ya que dicho efecto resulta bloqueado selectivamente por los antagonistas de estos receptores, teofilina y, en mayor medida, 8-fenilteofilina. La activación de los receptores  $P_1$  es un fenómeno implicado igualmente en la vasodilatación cerebral producida por AMP, ADP y ATP, aunque su importancia relativa no es la misma para los cuatro agonistas, puesto que ADP y, sobre todo, ATP, exhiben una menor sensibilidad frente al bloqueo con 8-fenilteofilina que adenosina y AMP.

3.- Aunque no directamente demostrada, la existencia de un segundo tipo de receptor con el cual interaccionaría el ATP para desarrollar su efecto vasodilatador (receptores purinérgicos  $P_2$ ), resulta evidente cuando se siguen los criterios establecidos para la clasificación de los receptores purinérgicos: en primer lugar, la potencia dilatadora de ATP es superior a la de adenosina; y en segundo lugar, la vasodilatación producida por este nucleótido no puede justificarse totalmente por su interacción con receptores  $P_1$ .

4.- Los receptores  $P_1$  identificados corresponden al subtipo  $A_2$ , puesto que los derivados NECA y 2-ClAD son vasodilatadores más potentes que el derivado L-PIA. Este subtipo de receptor muestra, "in vivo", una clara estereoselectividad, ya que el estereoisómero L- es más potente que el estereoisómero D-PIA.

5.- La disparidad de las respuestas de las arterias cerebrales a ATP y su análogo estable,  $\alpha,\beta$ -mATP, revela la heterogeneidad de los receptores  $P_2$ . Existen receptores  $P_{2x}$  con los cuales interacciona el derivado  $\alpha,\beta$ -mATP para producir vasoconstricción, y receptores  $P_{2y}$  con los cuales interacciona el ATP para producir vasodilatación. Ninguna de las dos respuestas implica la estimulación de la síntesis de prostaglandinas, puesto que ninguna de ellas resulta modificada por la indometacina.

6.- La respuesta contráctil de las arterias cerebrales aisladas a ATP, está mediada por un tipo de receptor diferente al  $P_{2x}$ , ya que dicha respuesta no resulta abolida tras la desensibilización con  $\alpha,\beta$ -mATP. Además, la indometacina atenúa la respuesta contráctil a ATP, pero no a  $\alpha,\beta$ -mATP, sugiriendo la participación de las prostaglandinas en la primera de ellas.

7.- En condiciones basales, la adenosina no participa en la regulación fisiológica del flujo sanguíneo cerebral, puesto que el bloqueo de sus receptores específicos no modifica ni el flujo sanguíneo ni la resistencia vascular cerebrales.

## 7.- BIBLIOGRAFIA

ABDEL-HALIM, M.S.; SJOQUIST, B. y ANGGARD, E. Inhibition of prostaglandin synthesis in rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43:266-272, 1978.

ABOOD, L.G.; KOKETSU, K. y MIYAMOTO, S. Outflow of various phosphates during membrane depolarization of excitable tissues. *Am. J. Physiol.* 202:469-474, 1962.

ALBORCH, E. Cholinergic receptors in the cerebral arteries of the goat. En: *Cerebral Microcirculation and Metabolism*. J. Cervós-Navarro y E. Fritschka (Eds.), Raven Press:New York, pgs. 285-292, 1981.

ANDERSSON, B. y JEWELL, P.A. The distribution of carotid and vertebral blood in the brain and spinal cord of the goat. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 41:462-474, 1956.

ANGUS, J.A.; COBBIN, L.B.; EINSTEIN, R. y MAGUIRE, M.H. Cardiovascular actions of substituted adenosine analogues. *Br. J. Pharmacol.* 41:592-599, 1971.

BALDWIN, B.A. y BELL, P.R. 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. (London)* 97:203-215, 1963.

BECK, D.W.; VINTERS, H.V.; HART, M.N.; HENN, F.A. y CANCELLA, P.A. Uptake of adenosine into cultured cerebral endothelium. *Brain Res.* 271:180-183, 1983.

BERNE, R.M. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204:317-322, 1963.

BERNE, R.M.; RUBIO, G.R. y CURNISH, R.R. Release of adenosine from ischemic brain. Effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circ. Res.* 35:262-271, 1974.

BOARINI, D.J.; KASSELL, N.F.; SPROWELL, J.A. y OLIN, J. Intravertebral artery adenosine fails to alter cerebral blood flow in the dog. *Stroke* 15:1057-1060, 1984.

BOEYNAEMS, J.M.; PIROTON, S.; VAN COEVORDEN, A.; RASPE, E.; DEMOLLE, D. y ERNEUX, C. P<sub>2</sub>-purinergic receptors in vascular endothelial cells: from concept to reality. *J. Recept. Res.* 8:121-132, 1988.

BROWN, C.M. y BURNSTOCK, G. The structural conformation of the polyphosphate chain of the ATP molecule is critical for its promotion of prostaglandin biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 69:81-86, 1981.

BRUNS, R.F. Adenosine and xanthines. En: *Role of Adenosine in Cerebral Metabolism and Blood Flow*. V. Stefanovich e I. Okyayuz-Baklouti (Eds.), VSP:Utrecht, pgs. 57-80, 1988.

BRUNS, R.F.; DALY, J.W. y SNYDER, S.H. Adenosine receptors in brain membranes: binding of N<sup>6</sup>-ciclohexyl [<sup>3</sup>H]adenosine and 1,3-diethyl-8-[<sup>3</sup>H]phenylxanthine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5547-5552, 1980.

BULLOCH, J.M. y McGRATH, J.C. Blockade of vasopressor and vas deferens responses by  $\alpha,\beta$ -methylene ATP in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 94:103-108, 1988.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24:509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic "receptors". *J. Theoret. Biol.* 62:491-503, 1976.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. En: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. R.W. Straub y L. Bolis (Eds.), Raven Press:New York, pgs. 107-118, 1978.

BURNSTOCK, G. Drugs influencing purinergic mechanisms. En: *Pharmacology of the Vascular Wall*. J. Esplugues (Ed.), University Press:Valencia, pgs. 369-384, 1984.

BURNSTOCK, G. y BROWN, C. An introduction to purinergic receptors: history, classification and future developments. En: *Purinergic Receptors*. Receptors and Recognition, series B, vol. 12. G. Burnstock (Ed.), Chapman and Hall:London, pgs. 1-45, 1981.

BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; SATCHELL, D.G. y SMYTHE, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40:668-688, 1970.

BURNSTOCK, G. y KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16:433-440, 1985a.

BURNSTOCK, G. y KENNEDY, C. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ. Res.* 58:319-330, 1985b.

BUYNISKI, J.P. y RAPELA, C.E. Cerebral and renal vascular smooth muscle responses to adenosine. *Am. J. Physiol.* 217:1660-1664, 1969.

BYRNE, N.G. y LARGE, W.A. The effect of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP on the depolarization evoked by noradrenaline ( $\gamma$ -adrenoceptor response) and ATP in the immature rat basilar artery. *Br. J. Pharmacol.* 88:6-8, 1986.

CAMPBELL, G. Autonomic nervous supply to effector tissues. En: *Smooth Muscle*. E. Bülbring, A. Brading, A. Jones y T. Tomita (Eds.), Edward-Arnold:London, pgs. 451-495, 1970.

CHAPMAN, R.W.; SANTIAGO, T.W. y EDELMAN, N.H. Effects of graded reduction of brain blood flow on ventilation in unanesthetized goats. *J. Appl. Physiol.* 47:104-111, 1979.

COLLIS, M.G. y BROWN, C.M. Adenosine relaxes the aorta by interacting with an  $A_2$  receptor at an intracellular site. *Eur. J. Pharmacol.* 96:61-69, 1983.

COLLIS, M.G.; PALMER, D.B. y SAVILLE, V.L. Comparison of the potency of 8-phenyltheophylline as an antagonist at  $A_1$  and  $A_2$  adenosine receptors in atria and aorta from the guinea pig. *J. Pharm. Pharmacol.* 37:278-280, 1985.

CORNFORD, E.M. y OLDENDORF, W.H. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *Biochem. Biophys. Acta* 394:211-219, 1975.

CUELLO, A.C. (Ed.). *Cotransmission*. Macmillan Press:London, 1982.

DALY, J.W. Adenosine receptors. En: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, vol. 19. D.M.F. Cooper y K.B. Seamon (Eds.), Raven Press:New York, pgs. 29-46, 1985.

DANIEL, P.M.; DAWES, J.D.K. y PRICHARD, M.M.L. Studies of the carotid rete and its associated arteries. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*237:173-208, 1953.

DAWICKI, D.D.; AGARWAL, K.C. y PARKS, R.E. Adenosine metabolism in human whole blood. Effects of nucleoside transport inhibitors and phosphate concentration. *Biochem. Pharmacol.* 37:621-626, 1988.

DELBRO, D.; HEDLUND, H.; KENNEDY, C. y BURNSTOCK, G. Potent vasoconstrictor actions of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP, a stable analogue of ATP, on the rat vasculature, "in vivo". *Acta Physiol. Scand.* 123:501-503, 1985.

DE MEY, J.G. y VANHOUTTE, P.M. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol.* 316:347-355, 1981.

DEN HERTOOG, A.; PIELKENROOD, J. y VAN DEN AKKER, J. Effector mechanisms for  $\alpha,\beta$ -methylene ATP and ATP derivatives in guinea-pig taenia caeci. *Eur. J. Pharmacol.* 110:95-101, 1985.

DES ROSIERS, M.H.; KENNEDY, C.; PATLAK, C.S.; PETTIGREW, K.D.; SOKOLOFF, L. y REIVICH, M. Relationship between local cerebral blood flow and glucose utilization in the rat. *Neurology* 24:389-395, 1974.

DEUTICKE, B. y GERLACH, E. Abbau freier Nucleotide in Herz, Skeletmuskle, Gehirn und Leber der Ratte bei Sauerstoffmangel. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 292:239-254, 1966.

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

DRURY, A.N. y SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68:213-237, 1929.

DUVAL, N.; HICKS, P.E. y LANGER, S. Inhibitory effects of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP on nerve-mediated contractions of the nictitating membrane in reserpinized cats. *Eur. J. Pharmacol.* 110:373-377, 1985.

EDELMAN, N.H.; EPSTEIN, N.S.; CHERNIAK, N. y FISHMAN, A.P. Control of cerebral blood flow in the goat; role of the carotid rete. *Am. J. Physiol.* 223:615-619, 1972.

EDVINSSON, L. y FREDHOLM, B.B. Characterization of adenosine receptors in isolated cerebral arteries of cat. *Br. J. Pharmacol.* 80:631-637, 1983.

EDVINSSON, L. y MacKENZIE, E.T. Amine mechanisms in the cerebral circulation. *Pharmacol. Rev.* 28:275-348, 1977.

EMERSON, T.E., Jr. y RAYMOND, R.M. Involvement of adenosine in cerebral hypoxic hyperemia in the dog. *Am. J. Physiol.* 241:H134-H138, 1981.

FEDAN, J.S.; HOGABOOM, K.; WESTFALL, D.P. y O'DONELL, J.P. Comparison of contractions of the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens induced by ATP and related nucleotides. *Eur. J. Pharmacol.* 81:193-204, 1982.

FORRESTER, T.; HARPER, A.M.; MacKENZIE, E.T. y THOMSON, E.M. Effect of adenosine triphosphate and some derivatives on cerebral blood flow and metabolism. *J. Physiol.* 296:343-355, 1979.

FOX, I.H. y KELLEY, W.N. The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 47:655-686, 1978.

FRANCO, R.; CANELA, E.I. y BOZAL, J. Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem. Res.* 11:423-435, 1986.

FREDHOLM, B.B.; HEDQVIST, P.; LINDSTROM, K. y WENNMALM, M. Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation. *Acta Physiol. Scand.* 116:285-295, 1982.

FREDHOLM, B.B. y PERSSON, C.G.A. Xanthine derivatives as adenosine receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 81:673-676, 1982.

FREDHOLM, B.B. y SOLLEVI, A. Cardiovascular effects of adenosine. *Clin. Physiol.* 6:1-21, 1986.

FURCHGOTT, R.F. y ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980a.

FURCHGOTT, R.F. y ZAWADZKI, J.V. ATP relaxes rabbit aortic smooth muscle by both an indirect action via endothelial cells and a direct action. *Pharmacologist* 22:271, 1980b.

GORDON, J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233:309-319, 1986.

GORDON, J.L. y MARTIN, W. Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of  $^{86}\text{Rb}$  efflux from isolated endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 79:531-541, 1983.

GOTTSTEIN, U. y PAULSON, O.B. The effect of intracarotid aminophylline infusion on the cerebral circulation. *Stroke* 3:560-565, 1972.

GREEN, H.N. y STONER, H.B. *Biological Actions of the Adenine Nucleotides*. Lewis:London, 1950.

GRIFFITH, S.G.; MEGHJI, P.; MOODY, C.J. y BURNSTOCK, G. 8-phenyltheophylline: a potent P<sub>1</sub>-purinoceptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 75:61-64, 1981.

GROME, J.J. y STEFANOVICH, V. Differential effects of methylxanthines on local cerebral blood flow and glucose utilization in the conscious rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 333:172-177, 1986.

HARDEBO, J.E. y EDVINSSON, L. Adenine compounds: cerebrovascular effects "in vitro" with reference to their possible involvement in migraine. *Stroke* 10:58-62, 1979.

HARDEBO, J.E.; KAHRSTROM, J. y OWMAN, C. P<sub>1</sub>- and P<sub>2</sub>-purine receptors in brain circulation. *Eur. J. Pharmacol.* 144:343-352, 1987.

HARPER, A.M. Autoregulation of cerebral blood flow: influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 29:398-403, 1966.

HEISTAD, D.D.; MARCUS, M.L.; GOURLEY, J.K. y BUSIJA, D.W. Effect of adenosine and dipyridamole on cerebral blood flow. *Am. J. Physiol.* 240:H775-H780, 1981.

HOGABOOM, G.K.; O'DONELL, J.P. y FEDAN, J.S. Purinergic receptors: Photoaffinity analog of adenosine triphosphate is a specific adenosine triphosphate antagonist. *Science* 208:1273-1276, 1980.

JENG, S.J. y GUILLORY, R.J. The use of arylazido ATP analogs as photoaffinity labels for myosin ATPase. *J. Supramol. Struct.* 3:448-468, 1975.

JONZON, B.; BERGQUIST, A.; LI, Y.-O. y FREDHOLM, B.B. Effects of adenosine and two stable adenosine analogues on blood pressure, heart rate and colonic temperature in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 126:491-498, 1986.

KALARIA, R.N. y HARIK, S.I. Adenosine receptors and the nucleoside transporter in human brain vasculature. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 8:32-39, 1988.

KASAKOV, L. y BURNSTOCK, G. The use of the slowly degradable analog  $\alpha, \beta$ -methylene ATP, to produce desensitization of the  $P_2$ -purinoceptor: effect on non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 86:291-294, 1982.

KASAKOV, L.; ELLIS, J.; KIRKPATRICK, K.; MILNER, P. y BURNSTOCK, G. Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *J. Auton. Nerv. Syst.* 22:75-82, 1988.

KENAKIN, T.P. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. Raven Press:New York, 1987.

KENNEDY, C. y BURNSTOCK, G. ATP produces vasodilation via  $P_1$ -purinoceptors and vasoconstriction via  $P_2$ -purinoceptors in the isolated rabbit central ear artery. *Blood Vessels* 22:145-155, 1985.

KENNEDY, C.; DELBRO, D. y BURNSTOCK, G.  $P_2$ -purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* 107:161-168, 1985.

KENNEDY, C.; SAVILLE, V.L. y BURNSTOCK, G. The contributions of noradrenaline and ATP to the responses of the rabbit central ear artery to sympathetic nerve stimulation depend on the parameters of stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 122:291-300, 1986.

KONTOS, H.A. y WEI, E.P. Role of adenosine in cerebral arteriolar dilation from arterial hypoxia. *Fed. Proc.* 40:454, 1981.

KOZNIIEWSKA, E.; TRZEBSKI, A. y ZIELINSKI, A. Comparison of the effects of inorganic phosphate, adenosine and ATP on cerebral blood flow in dogs. *Proc. Physiol. Soc.* 96:96P-97P, 1975.

KREUTZBERG, G.W.; BARRON, K.D. y SCHUBERT, P. Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in glial plasma membranes. *Brain Res.* 158:247-257, 1978.

KUSCHINSKY, W.; SUDA, S. y SOKOLOFF, L. Local cerebral glucose utilization and blood flow during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol.* 241:H772-H777, 1981.

LASSEN, N.A. Cerebral blood flow and oxygen uptake. *Physiol. Rev.* 39:183-238, 1959.

LLUCH, S.; GOMEZ, B.; ALBORCH, E. y URQUILLA, P.R. Adrenergic mechanisms in the cerebral circulation of the goat. *Am. J. Physiol.* 228:985-989, 1975.

LLUCH, S.; REIMANN, C. y GLICK, G. Evidence for the direct effect of adrenergic drugs on the cerebral vascular bed of the unanesthetized goat. *Stroke* 4:50-56, 1973.

LONDOS, C. y WOLFF, J. Two distinct adenosine sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 7:5482-5486, 1977.

MACHALY, M.; DALZIEL, H.H. y SNEDDON, P. Evidence for ATP as a cotransmitter in dog mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* 147:83-91, 1988.

MAGNUSSEN, I. y HOEDT-RASMUSSEN, K. The effect of intra-arterial administered aminophylline on cerebral hemodynamics in man. *Acta Neurol. Scand.* 55:131-136, 1977.

MAGUIRE, M.H. y SATCHELL, D.G. The contribution of adenosine to the inhibitory actions of adenine nucleotides on the guinea-pig taenia coli: studies with phosphate-modified adenine nucleotide analogs and dipyridamole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211:626-631, 1979

McBEAN, D.E.; HARPER, A.M. y RUDOLPHI, K.A. Effects of adenosine and its analogues on porcine basilar arteries: are only A<sub>2</sub> receptors involved? *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 8:40-45, 1988.

MELDRUM, L.A. y BURNSTOCK, G. Evidence that ATP acts as co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 92:161-163, 1983.

MILETICH, D.J.; IVANKOVIC, A.D.; ALBRECHT, R.F. y TOYOOKA, E.T. Cerebral hemodynamics following internal maxillary artery ligation in the goat. *J. Appl. Physiol.* 38:942-945, 1975.

MISTRY, G. y DRUMMOND, G.I. Adenosine metabolism in microvessels from heart and brain. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18:13-22, 1986.

MORII, S.; KO, K.R.; NGAI, A.C. y WINN, H.R. Attenuation of hypoxic hyperemia and pial arteriolar vasodilation by theophylline: The role of adenosine in cerebral blood flow regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 5 (Suppl. 1):S525-S526, 1985.

MORII, S.; NGAI, A.C.; KO, K.R. y WINN, H.R. Role of adenosine in regulation of cerebral blood flow: effects of theophylline during normoxia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 253:H165-H175, 1987.

NAGATA, H.; NIMORI, Y.; NAKAMURA, S. y KAMEYAMA, M. Regional and subcellular distribution in mammalian brain of the enzymes producing adenosine. *J. Neurochem.* 42:1001-1007, 1984.

NAKAYAMA, K. Active and passive mechanical properties of ring and spiral segments of isolated dog basilar artery assessed by electrical and pharmacological stimulations. *Blood Vessels* 25:285-298, 1988.

NEEDLEMAN, P.; MINKES, M.S. y DOUGLAS, J.R. Stimulation of prostaglandin biosynthesis by adenine nucleotides. Profile of prostaglandin release by perfused organs. *Circ. Res.* 34:455-460, 1974.

NIELSEN, K.C. y OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 27:33-42, 1971.

NORDSTROM, C.H.; REHNCRONA, S.; SIESJO, B.K. y WESTERBERG, E. Adenosine in rat cerebral cortex: Its determination, normal values, and correlation to AMP and cyclic AMP during shortlasting ischemia. *Acta Physiol. Scand.* 101:63-71, 1977.

PATON, D.M. Presynaptic neuromodulation mediated by purinergic receptors. En: *Purinergic Receptors. Receptors and Recognition*, series B, vol. 12. G. Burnstock (Ed.), Chapman and Hall: London, pgs. 201-219, 1981.

PEARSON, J.D. y GORDON, J.L. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 281:384-386, 1979.

PHILLIS, J.W.; DELONG, R.E. y TOWNER, J.K. Adenosine deaminase inhibitors enhance cerebral anoxic hyperemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 5:295-299, 1985.

PHILLIS, J.W.; PRESTON, G. y DELONG, R.E. Effects of anoxia on cerebral blood flow in the rat brain: evidence for a role of adenosine in autoregulation. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 4:586-592, 1984.

PHILLIS, J.W.; WALTER, G.A.; O'REGAN, M.H. y STAIR, R.E. Increases in cerebral cortical perfusate adenosine and inosine concentrations during hypoxia and ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 7:679-686, 1987.

PHILLIS, J.W. y WU, P.H. The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.* 72C:179-187, 1982.

PHILLIS, J.W. y WU, P.H. Roles of adenosine and adenine nucleotides in the central nervous system. En: *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives*. J.W. Daly, Y. Kuroda, J.W. Phillis, H. Shimizu y M. Ui (Eds.), Raven Press: New York, pgs. 219-236, 1983.

PICKARD, J.D. Role of prostaglandins and arachidonic acid derivatives in the coupling of cerebral blood flow to cerebral metabolism. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 1:361-384, 1981.

PIROTTON, S.; RASPE, E.; DEMOLLE, D.; ERNEUX, C. y BOEYNAEMS, J.M. Involvement of inositol 1,4,5-triphosphate and calcium in the action of adenine nucleotides on aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 262:17461-17466, 1987.

PLUM, F.; GJEDDE, A. y SAMSON, F.E. Neuroanatomical functioning mapping by the radioactive 2-deoxy-D-glucose method. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* 14:457-518, 1976.

POPOLI, P.; BENEDETTI, M. y SCOTTI de CAROLIS, A. Anticonvulsant activity of carbamazepine and N<sup>6</sup>-1-phenylisopropyladenosine in rabbits. Relationship to adenosine receptors in central nervous system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29:533-539, 1988.

PROCTOR, K.G. Intestinal arteriolar responses to mucosal and serosal applications of adenosine analogues. *Circ. Res.* 61:187-193, 1987.

RALL, T.W. Estimulantes del sistema nervioso central. Las metilxantinas. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad (Eds.), Panamericana: Madrid, pgs. 561-573, 1986.

REHNCRONA, S.; SIESJO, B.K. y WESTERBERG, E. Adenosine and cyclic AMP in cerebral cortex of rats in hypoxia, status epilepticus and hypercapnia. *Acta Physiol. Scand.* 104:453-463, 1978.

REIMANN, C.; LLUCH, S. y GLICK, G. Development and evaluation of an experimental model for the study of the cerebral circulation in the unanesthetized goat. *Stroke* 3:322-328, 1972.

RIBEIRO, J.A. y LIMA, M.S. The hypotensive effect of intracarotid injections of adenosine triphosphate depends on its hydrolysis to adenosine. *Pharmacol. Res. Commun.* 17:255-260, 1985.

ROY, C.S. y SHERRINGTON., C.S. On the regulation of the blood supply of the brain. *J. Physiol.* 11:85-108, 1890.

SALAICES, M.; DE GREGORIO, A. y MARIN, J. Study of vasodilator effects of papaverine, adenosine and related drugs in isolated cat cerebral arteries. *Gen. Pharmac.* 16:633-636, 1985.

SAUVE, R.; PARENT, L.; SIMONEAU, C. y ROY, G. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent  $K^+$  channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.* 412:469-481, 1988.

SCHRADER, J.; WAHL, M.; KUSCHINSKY, W. y KREUTZBERG, G.W. Increase of adenosine content in cerebral cortex of the cat during bicuculline-induced seizures. *Pflügers Arch.* 387:245-251, 1980.

SCHWABE, U. y TROST, T. Characterization of adenosine receptors in rat brain by  $(-)[^3H]N^6$ -phenylisopropiladenosine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 313:179-188, 1980.

SNEDDON, P. y BURNSTOCK, G. Inhibition of excitatory junction potentials in guinea-pig vas deferens by  $\alpha, \beta$ -methylene ATP: further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 100:85-90, 1984.

SNEDDON, P. y WESTFALL, D.P. Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 347:561-580, 1984

SNYDER, S.H. Adenosine as a neuromodulator. *Ann. Rev. Neurosci.* 8:103-124, 1985.

SOKOLOFF, L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J. Neurochem.* 29:13-26, 1977.

SOKOLOFF, L. Local cerebral energy metabolism: its relationship to local functional activity and blood flow. En: *Cerebral Vascular Smooth Muscle and Its Control*. Ciba Foundation Symposium 56. M.J. Purves y K. Elliot (Eds.), Elsevier:Amsterdam, pgs. 171-197, 1978.

SOLLEVI, A.; ERICSON, K.; ERIKSSON, L.; LINDQVIST, C.; LAGERKRANSER, M. y STONE-ELANDER, S. Effect of adenosine on human cerebral blood flow as determined by positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 7:673-678, 1987.

SOLLEVI, A.; LAGERKRANSER, M.; ANDREEN, M. e IRESTEDT, L. Relationship between arterial and venous adenosine levels and vasodilatation during ATP- and adenosine-infusion in dogs. *Acta Physiol. Scand.* 120:171-176, 1984.

STJARNE, L. y ASTRAND, P. Relative pre- and postjunctional roles of noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate as neurotransmitters of the sympathetic nerves of guinea-pig and mouse vas deferens. *Neurosci.* 14:929-946, 1985.

SU, C. Purinergic receptors in blood vessels. En: *Purinergic Receptors*. Receptors and Recognition, series B, vol. 12. G. Burnstock (Ed.), Chapman and Hall:London, pgs. 95-117, 1981.

TALLARIDA, R.J. y MURRAY, R.B. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*. Springer-Verlag:New York, 1987.

TAWADA, Y.; FURUKAWA, K.-I. y SHIGEKAWA, M. ATP-induced calcium transient in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J. Biochem.* 102:1499-1509, 1987.

TODA, N. The action of vasodilating drugs on isolated basilar, coronary and mesenteric arteries of the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 191:139-146, 1974.

URQUILLA, P.R.; VAN DYKE, K. y ROBINSON, R. Relaxant effects of adenine nucleosides and nucleotides on canine cerebral arteries. *Fed. Proc.* 35:699, 1976.

VAN WYLEN, D.G.L.; PARK, T.S.; RUBIO, R. y BERNE, R.M. Brain dialysate adenosine (ADO) concentration during cerebral autoregulation in the adult rat. *Fed. Proc.* 46:354, 1987.

VIDAL, M.; HICKS, P.E. y LANGER, S.Z. Differential effects of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP on responses to nerve stimulation in SHR and WKY tail arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332:384-390, 1986.

WAHL, M. y KUSCHINSKY, W. The dilatatory action of adenosine on pial arteries of cats and its inhibition by theophylline. *Pflügers Arch.* 362:55-59, 1976.

WARDLAND, J.J.I. y BURNSTOCK, G. Effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the adrenergic and purinergic components of sympathetic nerve responses of the rabbit saphenous artery. *Br. J. Pharmacol.* 92:871-880, 1987.

WIKLUND, N.P. y GUSTAFSSON, L.E. Indications for P<sub>2</sub>-purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 148:361-370, 1988.

WILLIAMS, M. Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27:315-345, 1987.

WILLIAMS, M. y RISLEY, E.A. Biochemical characterization of putative central purinergic receptors by using 2-chloro[<sup>3</sup>H]adenosine, a stable analog of adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6892-6896, 1980.

WINN, H.R.; MORII, S. y BERNE, R.M. The role of adenosine in autoregulation of cerebral blood flow. *Ann. Biomed. Engng.* 13:321-328, 1985.

WINN, H.R.; RUBIO, R. y BERNE, R.M. Brain adenosine production during 60 seconds of ischemia. *Circ. Res.* 45:486-492, 1979.

WINN, H.R.; RUBIO, R. y BERNE, R.M. The role of adenosine in the regulation of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 1:239-244, 1981a.

WINN, H.R.; RUBIO, R. Y BERNE, R.M. Brain adenosine concentration during hypoxia in rats. *Am. J. Physiol.* 241:H235-H242, 1981b.

WU, P.H. y PHILLIS, J.W. Uptake of adenosine by isolated rat brain capillaries. *J. Neurochem.* 38:687-690, 1982.

WU, P.H.; PHILLIS, J.W.; BALLS, K. y RINALDI, B. Specific binding of 2'-[<sup>3</sup>H]chloroadenosine to rat brain membranes. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 58:576-579, 1980.

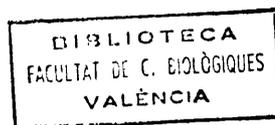
WYATT, D.G. Blood flow and blood velocity measurement "in vivo" by electromagnetic induction. *Med. Biol. Eng. Comput.* 22:193-211, 1984.

YAMAMOTO, T.; GEIGER, J.D.; DADDONA, P.E. y NAGY, J.I. Subcellular, regional and immunohistochemical localization of adenosine deaminase in various species. *Brain Res. Bull.* 19:473-484, 1987.

YOUNG, J.D. y JARVIS, S.M. The use of ligands in the study of the nucleoside-transport complex. Nitrobenzylthioinosine. En: *Methods in Pharmacology*. D.M. Paton (Ed.), Plenum Press:New York, pgs. 181-190, 1985.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs N.J., 1974.

ZETTERSTROM, T.; UNGERSTEDT, V.U.; TOSSMAN, U.; JONZON, B. y FREDHOLM, B.B. Purine levels in the intact brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci. Lett.* 29:111-115, 1982.



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

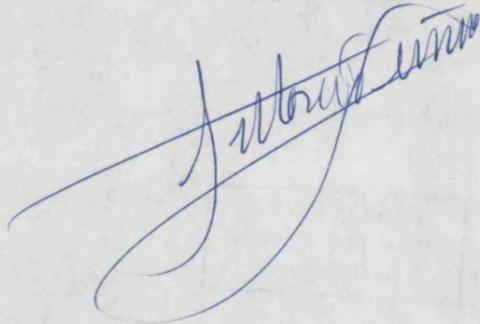
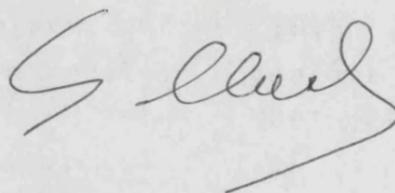
Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. German Tarregrosa Bernabe  
la calificación de Apto Cum laude

Valencia, a 23 de Junio de 1989

El Secretario,

El Presidente

A large, stylized handwritten signature in blue ink, likely belonging to the President of the Tribunal.A large, stylized handwritten signature in blue ink, likely belonging to the Secretary of the Tribunal.