



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de la inhibición farmacológica de la calmodulina sobre la capacidad de la nifedipina para inhibir la contracción vascular mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

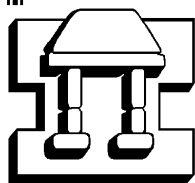
**PRESENTA:**

**MARÍA ESTHER MARTÍNEZ GARCÍA**

**TUTOR: Dr. JOSÉ ANTONIO TERRÓN SIERRA**

Sección Externa de Farmacología

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO.**

**2003**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de la inhibición farmacológica de la calmodulina sobre la capacidad de la nifedipina para inhibir la contracción vascular mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

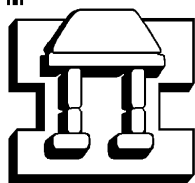
**PRESENTA:**

**MARÍA ESTHER MARTÍNEZ GARCÍA**

**TUTOR: Dr. JOSÉ ANTONIO TERRÓN SIERRA**

Sección Externa de Farmacología

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO.**

**2003**

## *DEDICATORIA*

*A MIS PADRES:           JOSEFA GARCIA TELLO*  
*CARLOS MARTÍNEZ PÉREZ*

*A mi madre* porque siempre ha estado en todos los momentos de mi vida, a quien agradezco las palabras de aliento y sobre todo sus consejos, a quien siempre me da todo sin pedir nada a cambio, eres el ser mas maravilloso que hay. Doy gracias a Dios por designarte como mi madre.

*A mi padre* por todos sus esfuerzos infinitos que hizo porque sus hijos sean profesionistas, y de quien he aprendido el amor al trabajo y la responsabilidad que implica desarrollarse en cualquier actividad. Ni con las palabras mas hermosas, ni aun con toda una riqueza podría pagar todo lo que me has dado.

*Y HERMANOS:           J. CARLOS*  
*C.. RAUL*  
*TOMAS*

“ Por su apoyo, confianza y amor que siempre me han tenido”.

## *AGRADECIMIENTOS:*

*A MI TUTOR:* Dr. J. ANTONIO TERRON SIERRA.

Por su confianza y apoyo que me brindo durante la realización de este proyecto, y que forjo en mi las ideas de todo un mundo infinito que hay que conocer.

*A MIS AMIGOS, COMPAÑEROS DE TRABAJO Y PROFESORES* que me orientaron y sobre todo que me brindaron su confianza y amistad.



## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES GENERALES</b>	
Definición y clasificación de los receptores $\alpha$ 1-adrenérgicos.....	5
Vías de señalización.....	8
Receptores $\alpha$ 1-adrenérgicos en el sistema cardiovascular.....	10
Canales de calcio y sus antagonistas.....	12
Mecanismos de movilización de calcio durante la contracción vascular.....	16
Calmodulina y su interacción con el $Ca^{++}$ en la contracción.....	17
<b>ANTECEDENTES ESPECIFICOS</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS.</b> .....	21
<b>OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES</b> .....	22
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	23
Protocolo experimental.....	25
Fármacos.....	27
Colección de datos y análisis estadístico .....	27
<b>RESULTADOS</b>	
Efecto de la FBZ sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal .....	29
Efecto de FBZ, en combinación con NIF, sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal.....	31
Efecto del CMZ sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal.....	35
Efecto del tratamiento combinado de CMZ con NIF sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por FEN en la aorta y la arteria caudal.....	37
<b>DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	49
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	50
<b>REFERENCIAS</b> .....	51



## RESUMEN

Se ha demostrado que el antagonista irreversible de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, fenoxibenzamina (FBZ), incrementa la potencia de algunos bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  para inhibir las respuestas vasoconstrictoras mediadas por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos *in vivo* e *in vitro*. En vista de que la FBZ es más potente para amplificar los efectos inhibitorios de la nifedipina (NIF) que para bloquear las respuestas  $\alpha_1$ -adrenérgicas *in vivo*, es posible que tales propiedades amplificadoras de la FBZ se expliquen por un mecanismo no relacionado con la alquilación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, tal como la inhibición de la calmodulina. Esta proteína puede ser inhibida irreversiblemente por la FBZ. Con base en estas observaciones, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la inhibición farmacológica de la calmodulina sobre la capacidad de la NIF para inhibir la contracción mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  en la aorta y arteria caudal de la rata, respectivamente. Para ello, se montaron anillos sin endotelio de aorta y arteria caudal de ratas Wistar en cámaras de tejido aislado para el registro de la tensión isométrica. Posteriormente se analizó la contracción producida por concentraciones crecientes del agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, fenilefrina (FEN), en presencia de los siguientes tratamientos: 1) vehículo, 2) FBZ (1, 10 y 100nM), 3) calmidazolium (CMZ; 3, 10 y 30 $\mu$ M), 4) NIF (1 $\mu$ M), 5) FBZ (1, 10 y 100nM) + NIF (1 $\mu$ M) y CMZ (3, 10 y 30 $\mu$ M) + NIF (1 $\mu$ M). En los experimentos con FBZ, las preparaciones fueron preincubadas con el antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, BMY-7378 (aorta), y  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico, 5-metil-urapidil (5-MU; arteria caudal), para prevenir la acción alquilante de la FBZ sobre los receptores.

La FEN produjo un efecto contráctil dependiente de la concentración en ambas preparaciones. A pesar del efecto protector del BMY-7378 y del 5-MU, la FBZ produjo una reducción significativa del efecto máximo a la FEN con un desplazamiento moderado hacia la derecha; el CMZ produjo sólo una inhibición moderada de la respuesta a la FEN. Contrariamente a lo esperado, ni la FBZ ni el CMZ fueron capaces de potenciar el efecto inhibitorio de la NIF sobre las respuestas constrictoras inducidas por la FEN (1nM-100mM) en la aorta y en la arteria caudal. Estos resultados contrastan con los reportados por otros autores, lo cual puede ser debido a diferencias en las condiciones experimentales empleadas. De hecho, experimentos recientes en el laboratorio indican que la FBZ y el CMZ pueden en realidad incrementar la potencia de la NIF para inhibir la contracción vascular inducida por la noradrenalina en la aorta de rata. Es posible entonces que la participación relativa de los canales de calcio ( $Ca^{++}$ ) y de sus mecanismos de regulación durante la contracción vascular, incluida la modulación por calmodulina, dependan del agonista que se utilice.

## **INTRODUCCION**

### **Sistema Nervioso Simpático**

La adrenalina y la noradrenalina (NA), también denominadas como catecolaminas, son los principales mediadores de la actividad del sistema nervioso simpático y desempeñan un papel crucial en el control inmediato de la presión arterial y de otras funciones autonómicas vitales (Hoffman y Lefkowitz, 1996). Bajo condiciones de estimulación simpática (durante la reacción de pelea o huida, por ejemplo), se produce aumento de la frecuencia cardíaca, de la contractilidad miocárdica y de la presión sanguínea. También se presenta sudoración en manos y pies, vasoconstricción de arteriolas y venas cutáneas y viscerales, contracción de los esfínteres anal y vesical, e incremento del metabolismo energético para hacer frente a la demanda de energía, entre otros (Hoffman y Lefkowitz, 1996; Guimaraes y Moura, 2001).

El aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos mediante la irrigación sanguínea constituye un proceso fundamental para la supervivencia del organismo. El flujo sanguíneo es regulado importantemente por el sistema nervioso simpático mediante la acción principal de la NA. Esta sustancia es liberada de las terminales nerviosas simpáticas que inervan la mayor parte de los vasos sanguíneos periféricos, incluidas las arterias de resistencia o arteriolas, para producir aumento del tono vascular (i.e. vasoconstricción) y, consecuentemente, de la resistencia periférica y la presión arterial. Estas importantes acciones son mediadas por la unión de la NA a proteínas específicas localizadas en la membrana celular las cuales se conocen como receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Hoffman y Lefkowitz, 1996).

## **Utilidad y relevancia de los estudios de contractilidad vascular *in vitro***

Dada la complejidad del sistema cardiovascular y de los procesos que gobiernan su funcionamiento bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, el análisis de los mecanismos de contractilidad vascular se facilitan enormemente mediante la utilización de sistemas de tejido aislado. En estos sistemas es posible estudiar mecanismos de acción de fármacos a nivel del músculo liso vascular, así como los procesos fisiológicos y fisiopatológicos que determinan o modifican el tono de los vasos sanguíneos. Entre dichos procesos destacan, por ejemplo, la modulación del tono vascular por sustancias liberadas de la capa endotelial, la expresión diferencial de receptores a diversos agentes vasoactivos, como las catecolaminas, y las acciones tróficas de ciertas sustancias que repercuten en el engrosamiento de la pared vascular (i.e. hipertrofia), entre otros. Aunque los resultados muchas veces no son extrapolables al organismo completo, ellos proporcionan información valiosa acerca de los procesos específicos que pueden determinar o modular el tono vascular y, de manera conjunta, la resistencia periférica y la presión arterial. Este tipo de estudios a permitido avanzar en el conocimiento de las probables causas de algunas enfermedades de alta incidencia a nivel mundial, como la hipertensión arterial y la diabetes. Asimismo, resultados provenientes de estudios de contractilidad vascular han permitido desarrollar tratamientos para dichas enfermedades. Uno de los ejemplos más sobresalientes en esta área es el descubrimiento del factor relajante derivado del endotelio por Furchgott y Zawadzski en 1980, el cual revolucionó de manera impresionante el área de la fisiología y farmacología cardiovascular.

## ANTECEDENTES GENERALES

### **Definición y clasificación de los receptores $\alpha$ 1-adrenérgicos.**

Los receptores adrenérgicos son un grupo heterogéneo de glicoproteínas intrínsecas de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G y que, de manera general, se dividen en los tipos  $\alpha$  y  $\beta$  (Guimaraes y Moura, 2001; García-Sainz y col., 2000). Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos fueron posteriormente clasificados en los tipos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 mediante el uso del agente farmacológico, prazosina. Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos han sido subdivididos en los tipos  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 (Bylund y col., 1994; Varma y Deng, 2000; Zhong y Minneman, 1999). El cuadro 1 muestra las características generales de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 (Guimaraes y Moura, 2001; Lefkowitz JR. y col., 1995; Elliott MR. 1995). Debido al amplio rango de afinidad de los receptores  $\alpha$ 1 para la prazosina, Flavahan y Vahoutte (1986) propusieron su división en  $\alpha$ 1H (sitios con alta afinidad) y  $\alpha$ 1L (sitios con baja afinidad). A esta clasificación funcional se ha agregado el subtipo  $\alpha$ 1N, el cual tiene una afinidad relativamente baja para la prazosina, pero la afinidad por la yohimbina es mayor que la que se esperarí para un receptor adrenérgico (Muramatsu y col., 1990).

Diversos estudios farmacológicos, bioquímicos y de clonación molecular (Graham y col., 1996; Price y col., 1994; Hancock, 1996) han identificado tres subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 ( $RA\alpha$ 1). Los cuales, desde un punto de vista integrativo, corresponderían a subtipos del receptor  $\alpha$ 1H. En el caso de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, éstos fueron divididos en los subtipos  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B,  $\alpha$ 2C y  $\alpha$ 2D (Bylund, 1992). El cuadro 2 muestra la clasificación farmacológica y molecular de los tres subtipos del  $RA\alpha$ 1 con alta afinidad para la prazosina.

**CUADRO 1. Características generales de los receptores adrenérgicos**

<b>Receptor</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>	<b>Principal sistema efector</b>	<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
$\alpha 1$	Músculo liso: vascular	Contracción	Activación de fosfolipasa C fosfolipasa D fosfolipasa A2 vía proteína Gq	A $\geq$ NA>>Iso Fenilefrina Metoxamina	Prazosina
	gastrointestinal	Contracción			
	genitourinario	Hiperpolarización y relajación			
	Hígado	Glucogenólisis; Gluconeogénesis			
	Corazón	Aumento de la fuerza de contracción			
$\alpha 2$	Islotes pancreáticos (células B)	Disminución de secreción de insulina	Inhibición de adenilato ciclasa vía proteína Gi	A $\geq$ NA>>Iso Clonidina BHT-920	Rauwolscina
	Plaquetas	Agregación			
	Terminaciones Nerviosas	Disminución de la descarga de NA			
	Músculo liso Vascular	Contracción			

Modificado de Hoffman y Lefkowitz, 1996, y Guimaraes y Moura, 2001

**Cuadro 2.** Clasificación de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  con alta afinidad para la prazosina (Hoffman y Lefkowitz, 1996; Guimaraes y Moura, 2001).

<b>Farmacológica</b>	<b>Molecular actual</b>	<b>Molecular anterior</b>
$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1a}$	$\alpha_{1C}$
$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1b}$	$\alpha_{1b}$
$\alpha_{1D}$	$\alpha_{1d}$	$\alpha_{1a}, \alpha_{1d}, \alpha_{1a/d}$

Una propiedad importante de los receptores fisiológicos es que actúan por mecanismos catalíticos y por tanto, son amplificadores de señales bioquímicas. La existencia de receptores postsinápticos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  así como su participación en diversos procesos ya está bien documentada (McGrath.1982, Timmermans and Van Zwieten, 1982, Langer and Hicks, 1984). Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos median muchos de los efectos importantes de las catecolaminas endógenas. Las reacciones de importancia clínica incluyen contracción del músculo liso arterial y venoso, mediada por los receptores  $\alpha_1$ . Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos participan en la supresión de la emisión de los impulsos simpáticos, el incremento del tono vagal, la facilitación de la agregación plaquetaria, la inhibición de la descarga de noradrenalina y acetilcolina desde las terminaciones nerviosas y la regulación de los efectos metabólicos (Guimaraes S. and Moura.2001; Lefkowitz JR. et. al. 1995).

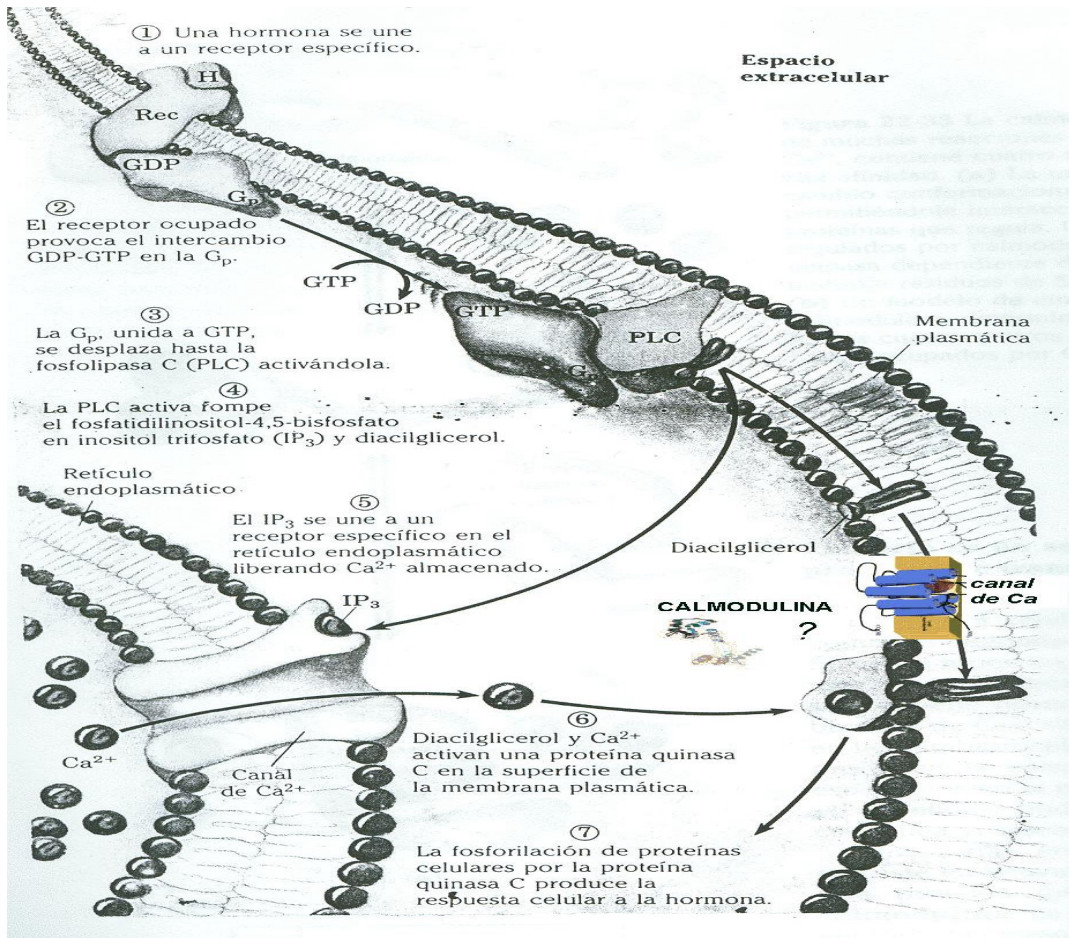
## Vías de señalización

Los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos incrementan el calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular libre como mecanismo de transducción primario (Vázquez-Prado y García-Sainz, 1996). La hidrólisis del fosfatidil-inositol constituye el mecanismo principal para la formación del segundo mensajero, 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ), relacionado con el control de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico (Minneman, 1988). La estimulación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos promueve la activación de una proteína G que a su vez modifica la función de la fosfolipasa C, favoreciendo la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato ( $\text{IP}_2$ ) en  $\text{IP}_3$  y diacilglicerol (DAG). Estas dos moléculas actúan a su vez como segundos mensajeros promoviendo la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de almacenes intracelulares y la estimulación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente (Hein y Kobilka, 1995; Zhong y Minneman, 1999; García-Sáinz y col., 2000) (Figura 1). La estimulación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos incrementa además el influjo de  $\text{Ca}^{++}$  vía la abertura de canales operados por voltaje, y activa a las fosfolipasas A y D (Han, 1987), a los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  y a los canales de potasio, así como la transcripción de genes de respuesta temprana (Graham y col., 1996; Varma y Deng 2000).

La complejidad de la señalización de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos se debe a la capacidad de los diferentes subtipos para acoplarse a efectores distintos, vía proteínas G diferentes. Asimismo, la diversidad de efectores unidos al receptor es específica de la especie y el tejido (Graham y col., 1996). No obstante, el conocimiento relativo a los mecanismos finos de transducción asociados a la



activación de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en el músculo liso vascular, así como en otros tejidos es aún limitado.



**Figura 1.** Vías de señalización asociadas a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos

## Receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos en el sistema cardiovascular

Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se encuentran localizados primordialmente en el músculo de las paredes de los vasos sanguíneos y su activación se asocia generalmente con vasoconstricción. La disponibilidad de fármacos antagonistas altamente selectivos ha permitido la realización de numerosos estudios destinados a determinar la participación relativa de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en los fenómenos de contracción vascular. El análisis regional de su distribución en la vasculatura sistémica indica que los tres subtipos participan en la contracción, aunque los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  parecen tener un papel predominante en la respuesta contráctil inducida por la NA en varios lechos vasculares (Kenny y col., 1995; Buckner y col., 1996). Así, estudios funcionales *in vitro* han demostrado que la contracción inducida por la NA y por fármacos agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos en la aorta de rata es mediada principalmente por el subtipo  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico (Ibarra y col., 2000; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996), mientras que la respuesta vasoconstrictora en la arteria caudal (Ibarra y col., 2000; Lachnit y col., 1997; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996) y en los lechos profundidos del mesenterio (Álvarez-Guerra y col., 1999; Bogнар y Enero, 1988) y de las extremidades inferiores de la rata (Zhu y col., 1998) es mediada fundamentalmente por el receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico. Experimentos *in vivo* han demostrado también una participación importante de los receptores  $\alpha_{1A}$ - y  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos en los incrementos de presión arterial inducidos por la administración intravenosa (i.v.) de fármacos agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos, tales como la fenilefrina (FEN) y la cirazolina (Zhou y Vargas, 1996), y por la estimulación eléctrica de la cadena simpática preganglionar (Castillo y col., 1998). Por otro lado, se ha

demostrado que la expresión de los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos aumenta con la edad (Ibarra y col., 1997) y que esta proteína se expresa en la vasculatura de resistencia de animales pre-hipertensos e hipertensos, lo cual sugiere su posible participación en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial (Villalobos-Molina et al, 1999).

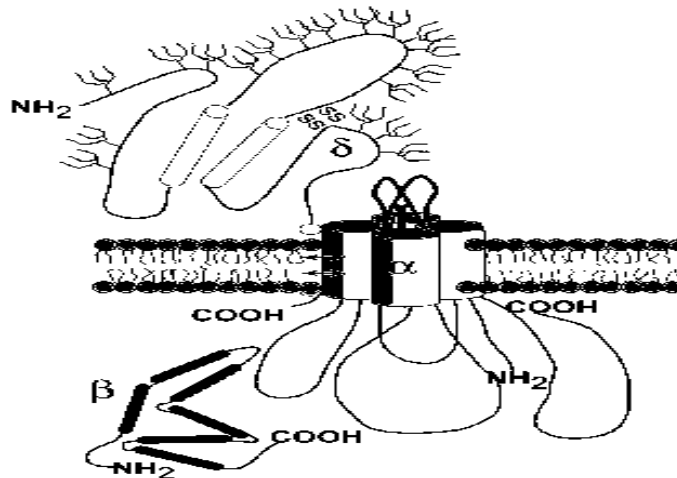
## Canales de calcio y sus antagonistas

El  $\text{Ca}^{++}$  puede penetrar a la célula por estructuras proteínicas llamadas canales. A la fecha, se han descritos cuatro tipos de canales selectivos para el  $\text{Ca}^{++}$  que se han denominado canales tipo L, T, N y P y cada uno de ellos tiene características y sensibilidad específica a diferentes fármacos como se muestra en el cuadro 3 (Catterall, y col., 1989).

<b>Cuadro 3. Clasificación de canales de calcio</b>			
Canal	Localización	Voltaje activación	Fármacos antagonistas
Tipo L	Músculo cardíaco, vascular y esquelético	-10 mv	Bloqueadores del canal lento
Tipo T	Tejido de marcapasos	-70 mv	Amilorida, $\text{Ni}^+$ , mibefradil
Tipo N	Neuronas	-10 mv	Omega-conotoxina (toxina molusco marino)
Tipo P	Cerebelo (células Purkinje)	-50 mv	A-aperta (toxina de araña)

(Catterall, y col., 1989).

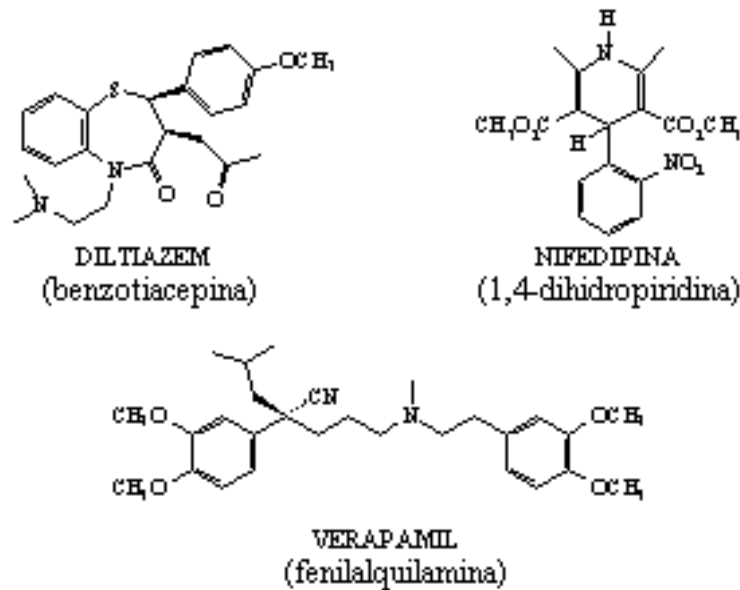
Los bloqueadores del canal de  $\text{Ca}^{++}$  lento actúan selectivamente en los canales tipo L, mismos que han sido ampliamente estudiados y caracterizados. Los canales tipo L se localizan fundamentalmente en el miocardio, el nodo aurículo-ventricular y las células del músculo liso vascular. Tienen una estructura oligomérica formada por cinco subunidades y un poro central por donde transita el  $\text{Ca}^{++}$  (Figura 2) Las subunidades se denominan  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , beta, gamma y delta (Catterall, y col., 1989).



**Figura 2.** Canal de calcio de tipo L. Se muestran las subunidades y el lugar donde se encuentran los sitios de interacción con los fármacos antagonistas (Catterall, y col., 1989).

Los agentes bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{++}$  son un importante grupo de drogas para el tratamiento de la hipertensión, ya que la contracción de la musculatura lisa es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular libre. Así, la inhibición del movimiento de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana plasmática puede disminuir la cantidad del ión total que llega a los sitios intracelulares. Debido a esto, todos los bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  disminuyen la presión sanguínea por relajación de la musculatura lisa arterial y disminución de la resistencia vascular periférica. Tres tipos de drogas son actualmente usadas en el tratamiento de la hipertensión bloqueando directamente canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje de tipo L (Figura 3): las 1,4-dihidropiridinas (p.e. nifedipina; NIF), benzotiazepinas (p.e. diltiazem) y fenilalquilaminas (p.e. verapamil). Los bloqueadores que inhiben los canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje en el tejido vascular lo hacen a concentraciones menores que las requeridas para interferir la liberación de calcio intracelular o para el bloqueo de

canales de  $\text{Ca}^{++}$  mediados por receptores. (Robertson y Robertson, 1996; Oates, 1996).



**Figura 3.** Formula estructural de los fármacos antagonistas selectivos de los canales de calcio tipo L. Se muestra un ejemplo del grupo de las 1,4-dihidropiridinas (nifedipina), las benzotiazepinas (diltiazem) y de las fenilalquilaminas (verapamil) (Robertson y Robertson, 1996; Oates, 1996).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar la selectividad de los bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{++}$  y los factores que determinan dicha selectividad, tales como la polaridad del fármaco, el tamaño de su molécula y las características funcionales del órgano en el cual se encuentra el canal de  $\text{Ca}^{++}$ , ya que la capacidad de penetración del fármaco al receptor dependerá de la frecuencia con que se abra el canal y del tiempo que permanezca abierto. Por ejemplo, la NIF, que es eléctricamente neutra a pH de 7.4, interactúa en la parte externa del canal y tiene preferencia por aquellos tejidos que abren su canal lentamente (vasos sanguíneos), mientras que el verapamil, que está enteramente cargado a pH de 7.4 y requiere una vía hieroglífica para ganar

acceso al interior del canal y ejercer su acción, tendrá más facilidad de penetración en aquellos tejidos que abren su canal con una frecuencia más elevada, como el miocardio (60 a 100 veces x') (Sanguinetti y col.,1984; Glossmann y col., 1983).

### **Mecanismos de movilización de calcio durante la contracción vascular**

Existen por lo menos 3 diferentes mecanismos en la contracción del músculo liso vascular que involucran el influjo de  $\text{Ca}^{++}$ . El primero involucra la apertura de canales de  $\text{Ca}^{++}$  sensibles a voltaje en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática con el consiguiente movimiento de  $\text{Ca}^{++}$  hacia el interior de la célula. El segundo se refiere al proceso de contracción inducido por agonistas, el cual ocurre sin la despolarización de la membrana y que involucra la participación de segundos mensajeros, entre los que destaca el  $\text{IP}_3$ ; éste último, actúa sobre receptores localizados en el retículo sarcoplásmico para dar lugar a la liberación de  $\text{Ca}^{++}$ . Finalmente, el tercero se refiere a la abertura del canal por acción de fármacos sobre un sitio receptor específico en la molécula de dicho canal (Robertson y Robertson, 1996; Oates, 1996).



## **Calmodulina y su interacción con el Ca<sup>++</sup> en la contracción**

La calmodulina es una proteína ácida con cuatro centros de unión de alta afinidad al Ca<sup>++</sup> la cual pertenece a una gran familia de proteínas fijadoras de Ca<sup>++</sup>. Tiene un peso molecular de 16700 Daltones y el 30% de su estructura esta constituida por los aminoácidos aspartato y glutamato (Cheung, 1980; Lehninger y col., 1995). La calmodulina se une al Ca<sup>++</sup> que se libera del retículo endoplásmico como resultado de la acción del mensajero intracelular IP<sub>3</sub>. El complejo resultante interactúa con proteínas cinasas específicas o multifuncionales dependientes de calmodulina y otras proteínas sensibles a la calmodulina lo cual altera su actividad produciendo con ello una variedad de respuestas fisiológicas (Van Bremen y col., 1986).

La calmodulina participa en la contracción muscular como respuesta a un aumento de la concentración de Ca<sup>++</sup>. La concentración citosólica basal de Ca<sup>++</sup> se mantiene a niveles muy bajos (<10<sup>-7</sup>M) debido a la acción de bombas específicas situadas en el retículo endoplásmico, en la mitocondria y en la membrana plasmática. Cuando la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> supera 10<sup>-6</sup>M (1 μM), la unión del ión a la calmodulina produce un cambio conformacional de ésta última y el complejo resultante puede asociarse con un gran número de proteínas y modular sus actividades (de ahí el nombre de "calmodulina") (Cheung, 1980; Lehninger y col., 1995; Van Bremen y col., 1986).

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Diversos fármacos tienen la capacidad de inhibir la actividad de la calmodulina. Su efecto puede ser evaluado in vitro sobre procesos que son regulados por la proteína, tal como la actividad de las enzimas miosina cinasa de cadena ligera (MLCK) o fosfodiesterasa (PDE) (Korstanje y col., 1988). Sin embargo, la mayoría de los antagonistas de la calmodulina actúan también como bloqueadores de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos o histaminérgicos a concentraciones dentro del rango nM, aunque el calmidazolium (CMZ) parece ser una excepción (Van Belle, 1981). A concentraciones moderadas (rango  $\mu$ M) muchas de estas drogas interfieren con la contracción del músculo liso vascular inducida por potasio, lo cual implica su interacción con canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje. La interacción de estos compuestos con la calmodulina ocurre solamente a concentraciones altas (rango  $\mu$ M-mM). Existen, sin embargo, compuestos altamente selectivos que incluyen el W-7 (N-(6-aminohehexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida; Hidaka y col., 1981) y el CMZ (Van Belle, 1981; Zimmer y Hofmann, 1984). Por otro lado, se ha reportado también que algunos antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos tienen la capacidad de inhibir la activación de fosfodiesterasa estimulada por calmodulina. Entre los más potentes destacan la fenoxibenzamina (FBZ) y la dibenamina, los cuales se unen irreversiblemente a la calmodulina (Earl y col., 1984; Cimino y Weiss, 1988).

Algunos estudios han demostrado que el antagonista irreversible  $\alpha$ 1-adrenérgico, fenoxibenzamina (FBZ), aumenta la potencia de algunos bloqueadores de los canales de  $Ca^{++}$ , para inhibir las respuestas vasoconstrictoras mediadas por los receptores  $\alpha$ 1-

adrenérgicos *in vivo* (Holck, 1988; Ruffolo y col., 1984; Timmermans y col., 1985,1987) e *in vitro* (Bognar y Enero, 1988). No obstante, la potencia de la FBZ para bloquear las respuestas mediadas por el receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico *in vivo* no se correlaciona con su potencia para incrementar la capacidad inhibitoria de la NIF, es decir, la FBZ es más potente para amplificar los efectos inhibitorios de la NIF (Timmermans y col., 1985). Por lo tanto, parece razonable considerar la posibilidad de que las citadas propiedades amplificadoras de la FBZ sobre el efecto inhibitorio de la NIF se expliquen por un mecanismo no relacionado con la alquilación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Un mecanismo alternativo para explicar las propiedades amplificadoras de la FBZ sobre los citados efectos inhibitorios de la NIF es la posible interacción de este fármaco con la calmodulina dado que, como se mencionó anteriormente, la FBZ es también un antagonista irreversible de dicha proteína (Earl y col.,1984).

Por otro lado, existe un número limitado de estudios que hayan investigado el posible papel de la calmodulina en los procesos de contracción vascular mediada por los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Por ejemplo, Korstanje y col. (1988) evaluaron el efecto de varios antagonistas de la calmodulina, tales como bepridil, CMZ, flunarizina, trifluoperazina y W-7, sobre los incrementos de la presión arterial diastólica mediados por activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 en ratas descerebradas y desmeduladas, y sobre las respuestas vasoconstrictoras mediadas por los receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 en el lecho perfundido de las extremidades inferiores de la rata. Sin embargo, los efectos nulos o moderados de tales compuestos no pudieron ser explicados por una interacción con la calmodulina (Korstanje y col., 1988). Con excepción de CMZ y W-7, la capacidad de algunos de estos y de otros antagonistas

de la calmodulina, tal como el Ro 22-4839 (Yajima y col., 1987), ha sido explicada por una acción bloqueante sobre los receptores adrenérgicos. Por el contrario, la capacidad del W-7 y del bepridil para inhibir la contracción inducida por NA y por despolarización con  $K^+$  en la aorta de rata y de conejo (Asano y Hidaka, 1985; Winslow y col., 1986), y la del bepridil para inhibir la contracción producida por la FEN y por despolarización con  $K^+$  en la vena portal de la rata (Campebell y col., 1986), fueron atribuidas a una acción a nivel intracelular (inhibición de la calmodulina). El W-7 produce también inhibición del tono vascular en tiras de arteria mesentérica previamente contraídas con NA y KCl 60mM (Asano y col., 1988). A la fecha, no existen reportes acerca del efecto de los fármacos inhibidores de la calmodulina sobre la contracción vascular mediada por los subtipos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  del receptor adrenérgico  $\alpha_1$ .

## HIPÓTESIS

La FBZ puede amplificar de manera diferencial el efecto inhibitorio de la NIF sobre la contracción vascular mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$ . Este efecto amplificador de la FBZ se debe a su interacción con la calmodulina, por lo que un inhibidor selectivo de esta proteína amplificará también el efecto inhibitorio de la NIF.

## **OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto de la inhibición farmacológica de la calmodulina sobre la capacidad de la NIF para inhibir la contracción mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  en la aorta y arteria caudal de la rata, respectivamente.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

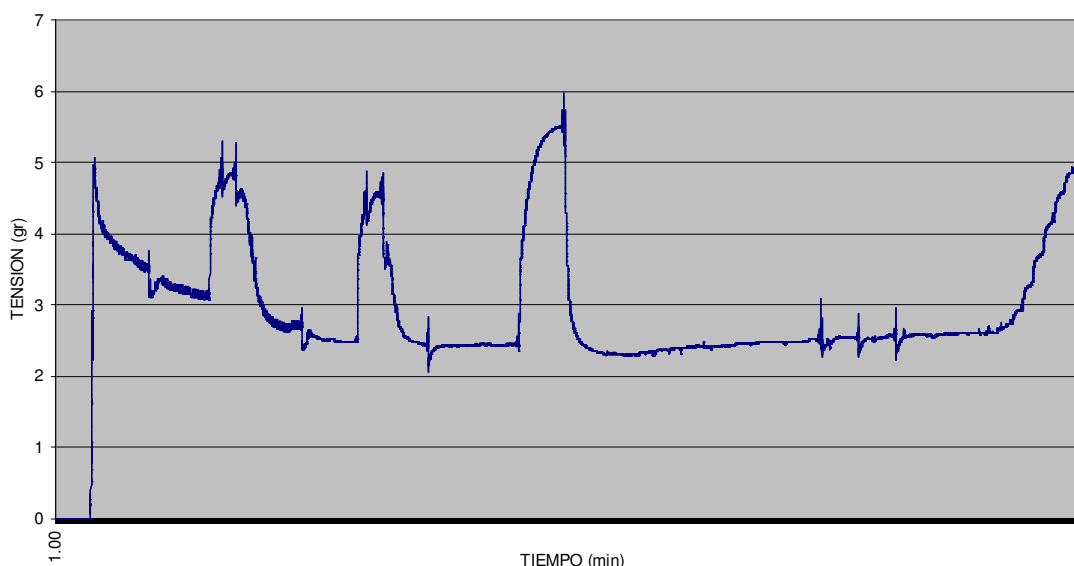
1. Evaluar el efecto de la FBZ sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN bajo condiciones de protección de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  con antagonistas específicos en la aorta y en la arteria caudal de la rata, respectivamente.
2. Analizar el efecto de la FBZ sola, y en combinación con NIF, sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y en la arteria caudal de la rata.
3. Evaluar el efecto del antagonista selectivo de la calmodulina, calmidazolium (CMZ), sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y en la arteria caudal de la rata.
4. Analizar el efecto del CMZ solo, y en combinación con NIF, sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y en la arteria caudal de la rata.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente proyecto se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300g de peso corporal. Se utiliza este sexo con el fin de evitar variaciones en los resultados posiblemente debidas a los cambios en el ciclo estral de ratas hembras. Los animales fueron sacrificados por sobre-exposición a vapores de éter etílico e inmediatamente después se procedió a diseccionar la aorta torácica y la arteria caudal, las cuales fueron colocadas en solución bicarbonatada de Krebs a temperatura ambiente. Se eligieron estas arterias porque esta bien documentado que la contracción debida a la estimulación de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos es mediada por los subtipos  $\alpha$ 1D (aorta) y  $\alpha$ 1A (arteria caudal) (ver antecedentes). Después de eliminar el tejido adherente, las preparaciones fueron seccionadas en anillos de 3-4 mm de longitud; de cada arteria se obtuvieron cuatro anillos adyacentes. El endotelio fue removido mecánicamente por fricción suave de la superficie luminal con unas pinzas finas de disección.

Los anillos fueron suspendidos horizontalmente entre dos ganchos de níquel-cromo en forma de L (0.5 y 0.2 mm de diámetro para aorta y caudal, respectivamente) en cámaras de tejido aislado. El gancho inferior fue fijado al fondo de la cámara mediante un sujetador de vidrio, mientras que el gancho superior estaba conectado directamente a un transductor de tensión isométrica (Grass FT03C) para registrar los cambios de tensión isométrica en analizadores de tensión (Digi-Med), los cuales estaban conectados a su vez a una computadora Pentium II (HP). Los datos fueron colectados a través de un programa de Digi-Med y procesados posteriormente con MS Excel 7.0.

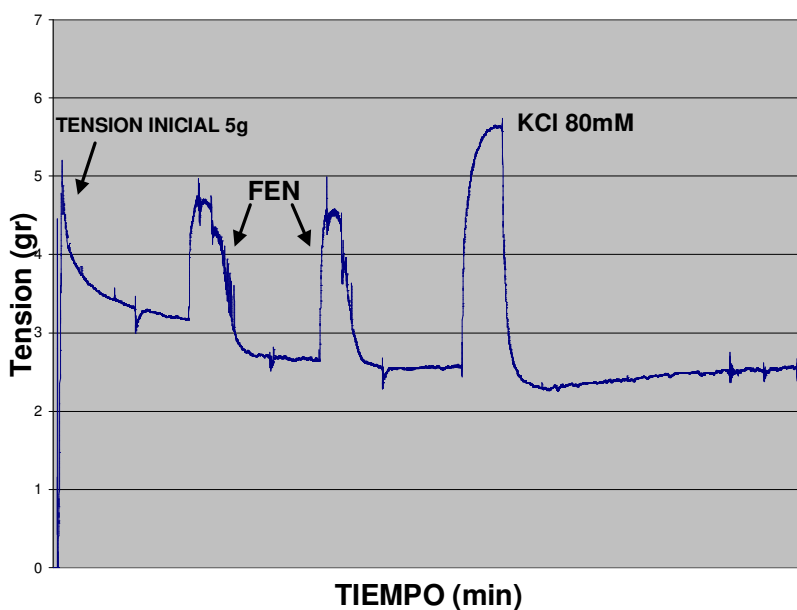
Los ganchos fueron montados en cámaras de tejido aislado que contenían 10 ml de solución bicarbonatada de Krebs con la siguiente composición (concentraciones milimolares): NaCl, 118; KCl, 4.8; CaCl<sub>2</sub>, 1.15; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; dextrose, 11; y Ca<sub>2</sub>EDTA, 0.026. Esta solución se mantuvo a una temperatura de 37°C con burbujeo continuo de una mezcla de gas carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) a un pH de 7.4. Posteriormente, se aplicó a los tejidos una tensión inicial de 5 y 2g para la aorta (Terrón y col., 1992) y la arteria caudal, respectivamente. Con el objeto de permitir que las preparaciones se equilibrasen, se dejó transcurrir un período de 120min durante el cual se generaron respuestas contráctiles cada 30min por exposición a FEN 0.1μM, seguidas de una contracción final por exposición a solución de Krebs conteniendo KCl 80mM (Figura 4 y 5). La ausencia de endotelio en los anillos fue verificada por exposición a acetilcolina (1μM) durante la última contracción a FEN (0.1μM).



**Figura 4.** Registro original de uno de nuestros experimentos completo en aorta mostrando el protocolo experimental general. El registro fue obtenido por



procesamiento del archivo original con MS Excel 7.0 y muestra los cambios de tensión registrados en analizadores de tensión Digi Med.

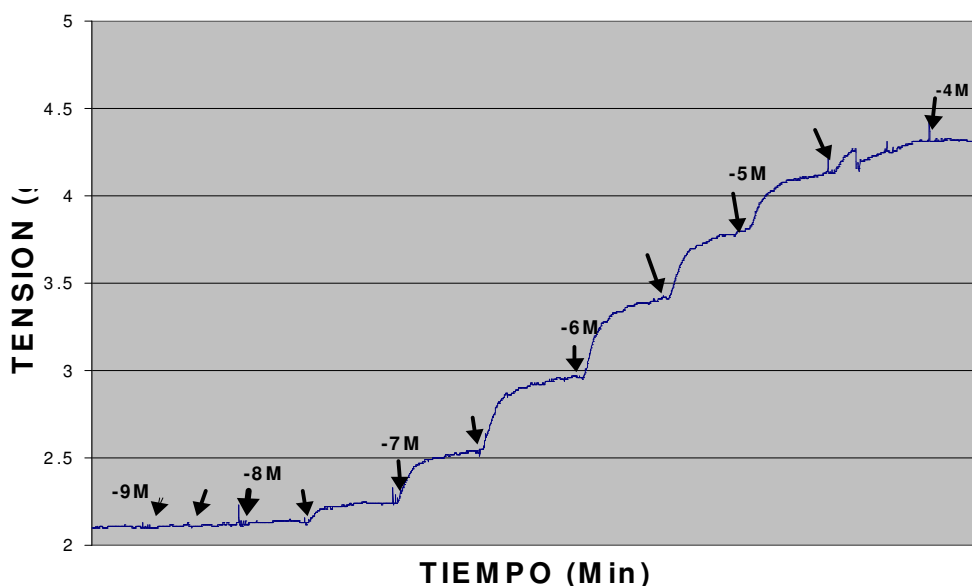


**Figura 5.** Registro original de un experimento en aorta donde se observan las respuestas contráctiles a la FEN (0.1 $\mu$ M) y al KCl (80 mM).

### Protocolo experimental

Una vez determinada la respuesta contráctil máxima al KCl 80mM, se construyó una curva concentración-respuesta (C-R) a la FEN (1nM–100 $\mu$ M) bajo las siguientes condiciones: 1) en presencia de vehículo (control); 2) en presencia de FBZ (1, 10 y 100 nM) sola, previa incubación con los antagonistas selectivos  $\alpha_{1D}$ , BMY-7378 (BMY; 0.1 $\mu$ M), y  $\alpha_{1A}$ , 5-metil-urapidil (5-MU; 0.1 $\mu$ M), para aorta y caudal respectivamente; 3) en presencia de NIF (1 $\mu$ M); 4) en presencia de FBZ (1, 10 y 100nM) + NIF (1 $\mu$ M), previa incubación con BMY 0.1 $\mu$ M (aorta) y 5-MU 0.1 $\mu$ M (caudal); 5) en presencia de CMZ (3, 10 y 30 $\mu$ M); y 6) en presencia de CMZ (3, 10 y 30 $\mu$ M) + NIF (1 $\mu$ M). El uso de BMY y 5-MU en los experimentos con FBZ tuvo por

objeto proteger a los receptores  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$ , respectivamente, de la acción alquilante de la FBZ. El periodo aproximado de incubación con cada uno de los tratamientos fue de 30min. Cada concentración de FEN (espaciada por un factor de  $10^{1/2}$ ) fue adicionada una vez que la respuesta máxima a la concentración anterior fue alcanzada (Figura 6). Las respuestas a la FEN en preparaciones tratadas con vehículo o con antagonista fueron producidas en tejidos independientes y solo una curva C-R fue construida en cada tejido. Cada experimento, realizado bajo las condiciones descritas en arterias provenientes de animales distintos, se repitió de 4 a 5 veces. La duración aproximada de cada experimento, desde el momento de la preparación de los tejidos hasta la realización de la curva C-R acumulativa a la FEN, fue de 5 horas. La fase experimental del presente estudio se realizó durante la época de otoño-invierno (octubre-marzo).



**Figura 6.** Registro original de un experimento en aorta mostrando los cambios de tensión que se producen durante la realización de una curva C-R a concentraciones crecientes de FEN (1nM-100µM).

## **Fármacos**

Los fármacos utilizados fueron FEN, CMZ, FBZ, BMY y 5-MU. Con excepción del CMZ, cuya solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) es estable durante varias semanas (de acuerdo con el proveedor), las soluciones de todos los fármacos fueron preparadas el día del experimento. La FEN fue preparada y diluida utilizando agua bidestilada; las soluciones fueron mantenidas en refrigeración durante el transcurso del experimento hasta el momento de su utilización. La solución stock ( $10^{-2}$ M) de NIF fue preparada en alcohol etílico. En el caso del CMZ y de la FBZ ( $10^{-2}$ M ambas), se utilizó DMSO y propilenglicol al 40%, respectivamente. Las diluciones sucesivas de todos los fármacos se prepararon con agua bidestilada. Finalmente, en el caso del BMY y del 5-MU, tanto la solución stock ( $10^{-2}$ M) como las diluciones correspondientes se realizaron con agua bidestilada.

## **Colección de datos y análisis estadístico**

Los registros de tensión en gramos fueron obtenidos por procesamiento de los archivos originales con MS Excel 7.0. En todos los casos, se determinaron los valores basales de tensión y aquellos obtenidos después de la incubación con cada fármaco. Todos los datos fueron tabulados y graficados utilizando los programas de MS Excel 7.0 y Prism GraphPad 2.0, respectivamente.

Las comparaciones de las curvas C-R construidas bajo las diferentes condiciones se realizaron mediante un análisis de variancia de dos vías de medidas repetidas seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls para determinar diferencias. Asimismo, los valores de la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) y del efecto máximo ( $E_{max}$ ) fueron obtenidos mediante un análisis de regresión no lineal

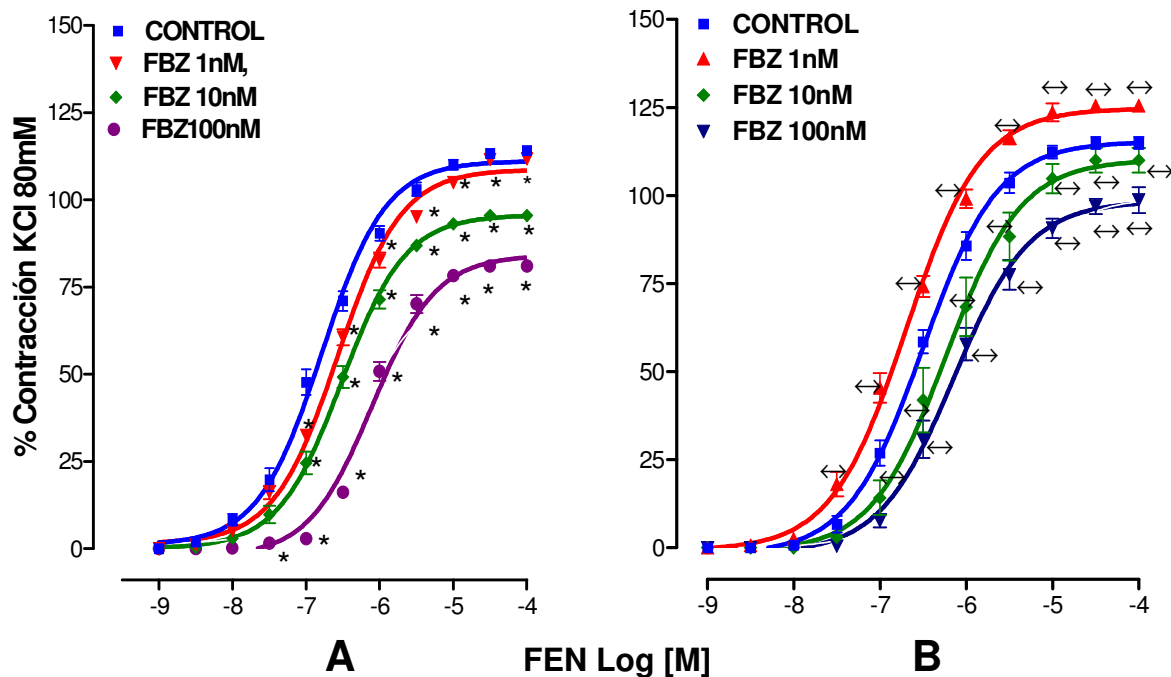
empleando el programa Prism GraphPad 2.0, y presentados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Finalmente, los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  fueron comparados utilizando la prueba de  $t$  no pareada. En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el nivel de significancia  $p$  fue menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

El estudio de los mecanismos de acción de los fármacos sobre los tejidos bajo estudio comprende habitualmente la construcción de relaciones **dosis-respuesta**, pues ello refleja la acción de dichos fármacos sobre sus receptores y la relación cinética de tal interacción. La correspondiente representación utilizando una escala logarítmica da lugar a una curva de tipo sigmoide en la que podemos determinar diversas variables, entre las que destacan: **a) Eficacia**: que corresponde al efecto máximo que un fármaco es capaz de producir y va a depender, en principio, del número de complejos fármaco-receptor y de la eficiencia con la que este complejo desencadena la secuencia de eventos que conduce al efecto farmacológico; **b) Potencia**: que corresponde a la afinidad del fármaco por su receptor y se refleja en términos de dosis o concentración. Generalmente la potencia de un fármaco se expresa en función de la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la respuesta máxima o concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) en el caso de fármacos agonistas, o como la concentración necesaria para bloquear el 50% de la respuesta ( $CI_{50}$ ) en el caso de fármacos antagonistas. La comparación de la  $CE_{50}$  o la  $CI_{50}$  de dos fármacos permite definir potencias relativas entre éstos, siendo más potentes aquellos fármacos cuyas  $DE_{50}$  o  $CI_{50}$  sean menores.

## RESULTADOS

### **Efecto de la FBZ sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal.**

En la Figura 7A y 7B se muestran las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en anillos de aorta y arteria caudal, respectivamente, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de FBZ (1, 10 y 100nM). Como se mencionó anteriormente, estos experimentos se realizaron en condiciones de protección de los receptores  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  con BMY y 5-MU (0.1 $\mu$ M, ambos), respectivamente. Bajo tales condiciones, la FEN produjo respuestas constrictoras dependientes de la concentración. En la aorta, este efecto fue inhibido por la FBZ observándose un desplazamiento de la curva C-R hacia la derecha junto con una depresión progresiva y significativa del Efecto máximo ( $E_{má}$ ) a la FEN (111 $\pm$ 1.7, 109 $\pm$ 1.8, 96 $\pm$ 0.5\* y 84 $\pm$ 2.4\* en ausencia y presencia de FBZ 1, 10 y 100nM, respectivamente; n=5; \*p<0.05 vs. control). Como consecuencia del desplazamiento de la curva C-R hacia la derecha y a pesar de la reducción del  $E_{max}$ , los valores de potencia ( $CE_{50}$ ) fueron alterados significativamente por la FBZ (6.8 $\pm$ 0.05, 6.6 $\pm$ 0.4, 6.5 $\pm$ 0.2\* y 6.1 $\pm$ 0.070\* en ausencia y presencia de FBZ 1, 10 y 100nM, respectivamente; n=5; \*p<0.05 vs. control) (Figura 7A).

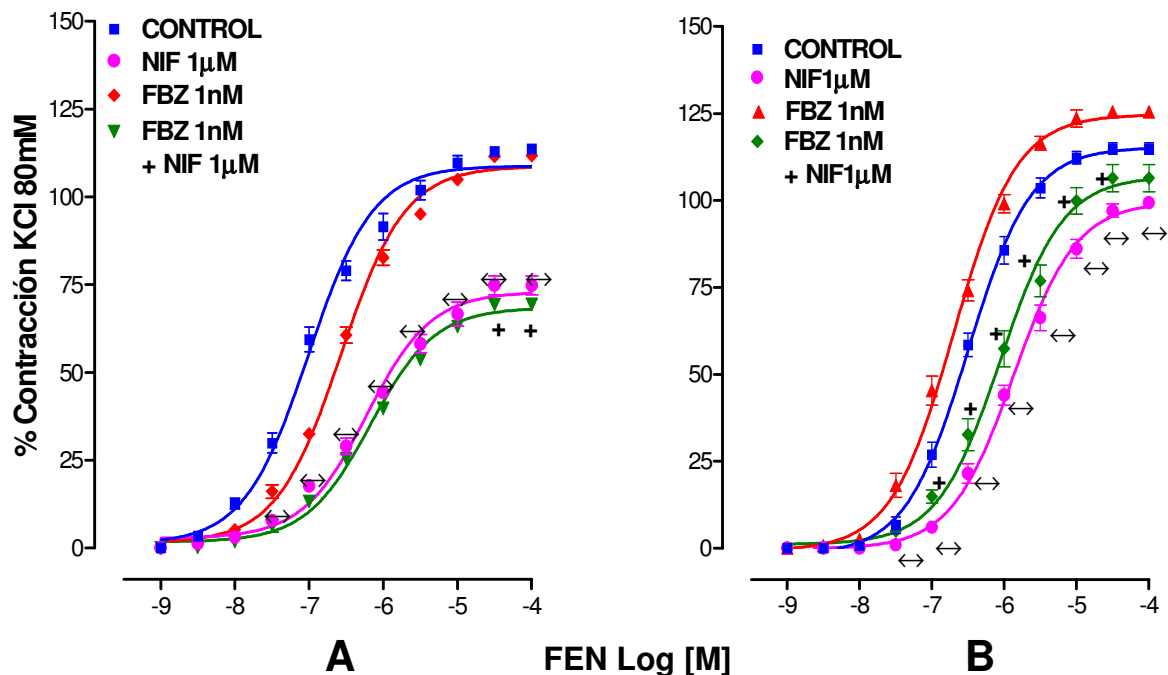


**Figura 7.** Efecto de concentraciones crecientes de fenoxibenzamina (FBZ) sobre la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal (B) de rata. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 5 observaciones. \*  $p < 0.05$  vs. control.

En el caso de la arteria caudal se observó un fenómeno interesante, pues la concentración más pequeña de FBZ (1nM) produjo una potenciación de la respuesta contráctil a la FEN. Las concentraciones mayores de FBZ produjeron un desplazamiento de la curva C-R hacia la derecha y una depresión significativa del  $E_{max}$  a la concentración mayor ( $115 \pm 0.8$ ,  $125 \pm 1.4^*$ ,  $110 \pm 1.4$  y  $98 \pm 1.2^*$  en ausencia y presencia de FBZ 1, 10 y 100nM, respectivamente;  $n=5$ ; \* $p < 0.05$  vs. control) (Figura 7B). La FBZ produjo un aumento significativo de la  $CE_{50}$  a la concentración de 100nM ( $6.5 \pm 0.02$ ,  $6.7 \pm 0.04$ ,  $6.2 \pm 0.03^*$ ,  $6.1 \pm 0.03^*$  en ausencia y presencia de FBZ 1, 10 y 100nM, respectivamente;  $n=5$ , \* $p < 0.05$  vs. control).

## **Efecto de FBZ, en combinación con NIF, sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal.**

El efecto de la concentración menor (1nM) de FBZ sobre la capacidad de la NIF para inhibir la respuesta contráctil a la FEN en anillos aórticos y de arteria caudal se muestra en la Figura 8A y 8B, respectivamente. Como se puede observar, la NIF produjo una depresión importante de la contracción a FEN en ambas preparaciones, siendo mayor el efecto en la aorta (Figura 8A). No obstante, la preincubación de las preparaciones con FBZ (1nM) no incrementó el efecto inhibitorio de la NIF sobre la contracción a la FEN, como se puede concluir a partir de los valores correspondientes de  $E_{max}$  en la aorta ( $109 \pm 2.2$ ,  $73 \pm 1.9^*$  y  $68 \pm 1.5$  para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$  y FBZ 1nM + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. control) y en la arteria caudal ( $115 \pm 0.8$ ,  $99.6 \pm 1.4^*$  y  $107 \pm 2$  para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$  y FBZ 1nM + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. control). Asimismo, esta concentración de FBZ + NIF no produjo un mayor desplazamiento de la curva C-R obtenida en presencia de NIF sola, como se puede juzgar a partir de los valores correspondientes de la  $CE_{50}$  en la aorta ( $7 \pm 0.07$ ,  $6 \pm 0.07^*$  y  $6.2 \pm 0.06$  para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$  y FBZ 1nM + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. control) y en la arteria caudal ( $6.5 \pm 0.02$ ,  $5.9 \pm 0.03^*$  y  $6 \pm 0.05$  para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$  y FBZ 1nM + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. control). En ambas preparaciones, el efecto de la combinación de FBZ + NIF puede interpretarse como la suma de los efectos producidos por los fármacos individuales (Figura 8A y 8B).

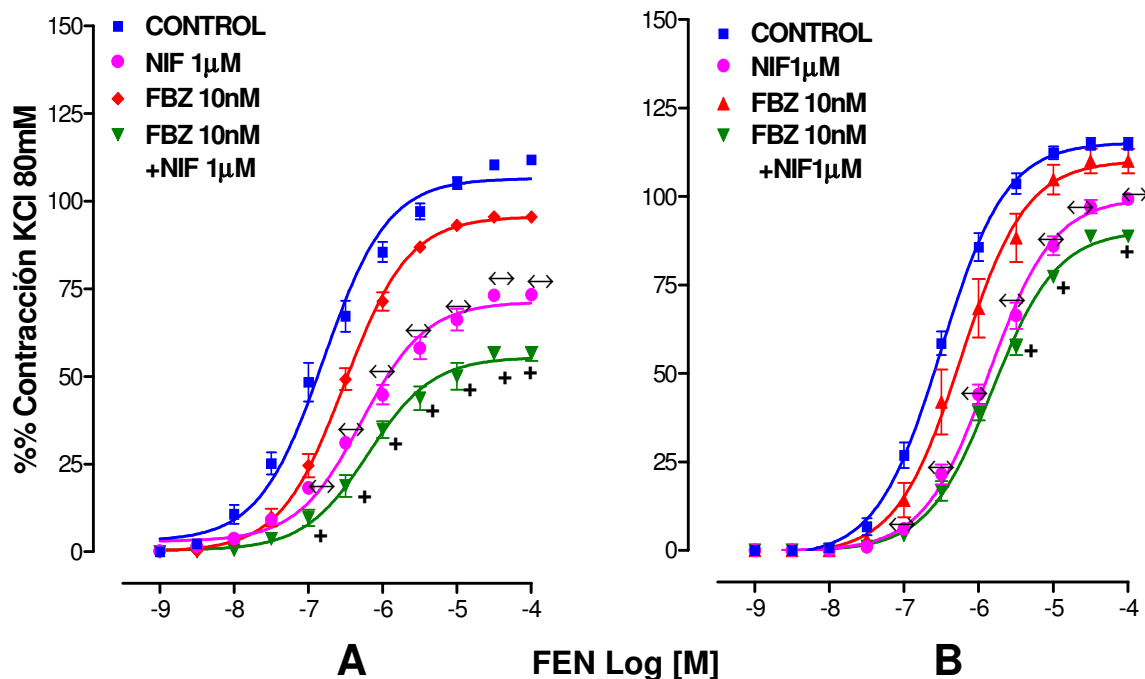


**Figura 8.** Efecto de la fenoxibenzamina (FBZ, 1nM) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil a la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal (B) de rata. Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl) 80mM. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 5 observaciones. \* $p < 0.05$  vs. control; \* $p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF

El efecto de la concentración intermedia (10nM) de FBZ sobre la capacidad de la NIF para inhibir la respuesta  $\alpha$ 1-adrenérgica en la aorta y la arteria caudal se muestra en la Figura 9A y 9B, respectivamente. Como se puede observar, ni en la aorta ( $107 \pm 2.6$ ,  $71 \pm 1.9^*$ ,  $96 \pm 0.5$  y  $56 \pm 1^{**}$ , para control, NIF 1 $\mu$ M, FBZ 10nM y FBZ 10nM + NIF 1 $\mu$ M, respectivamente;  $n=5$ , \* $p < 0.05$  vs. Control, \*\* $p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF) ni en la arteria caudal ( $115 \pm 0.8$ ,  $100 \pm 1.4^*$ ,  $110 \pm 1.4$ , y  $90 \pm 1.5$ , para control, NIF 1 $\mu$ M, FBZ 10nM y FBZ 10nM + NIF 1 $\mu$ M respectivamente;  $n=5$ , \* $p < 0.05$  vs. Control) la FBZ incrementó el efecto inhibitorio inducido por la NIF en términos del  $E_{max}$  pues la mayor depresión de éste último en presencia de la combinación se debe a que la FBZ sola deprimió el

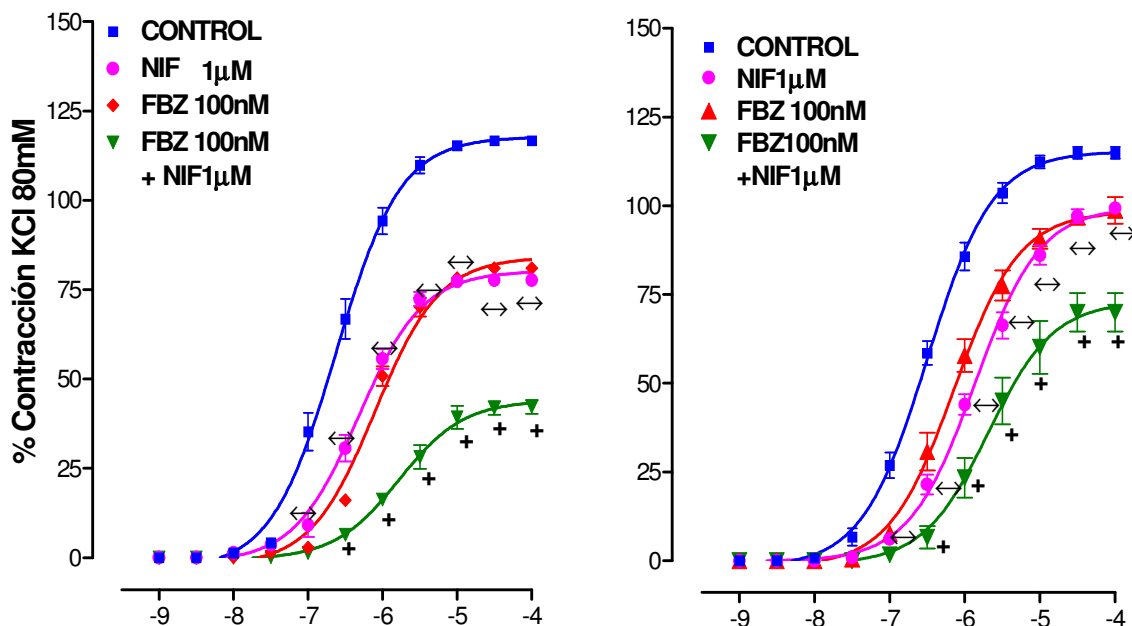


Emax a la FEN (véase también la Figura 9). La misma conclusión puede derivarse de los efectos de la FBZ sola y en combinación con NIF sobre los valores de potencia ( $CE_{50}$ ), tanto en la aorta ( $6.8 \pm 0.08$ ,  $6.3 \pm 0.07^*$ ,  $6.5 \pm 0.02^*$  y  $6.2 \pm 0.05$ , para control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $10 \text{ nM}$  y FBZ  $10 \text{ nM}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs control) como en la arteria caudal ( $6.5 \pm 0.02$ ,  $5.9 \pm 0.03^*$ ,  $6.2 \pm 0.03^*$  y  $5.8 \pm 0.04$ , para control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $10 \text{ nM}$  y FBZ  $10 \text{ nM}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs control). Al igual que con la concentración menor de FBZ, el efecto de la combinación de FBZ + NIF sobre la respuesta contráctil a la FEN puede considerarse como la suma del efecto de los fármacos individuales (Figura 9A y 9B) por lo que no existe un efecto potenciador de la FBZ sobre el efecto inhibitorio de la NIF.



**Figura 9.** Efecto de la fenoxibenzamina (FBZ;  $10 \text{ nM}$ ) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl)  $80 \text{ mM}$ . Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 5 observaciones.  $*p < 0.05$  vs control;  $+p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF.

Finalmente, el efecto del tratamiento con FBZ a una concentración de 100nM en la aorta y en la arteria caudal se muestra en la Figura 10A y 10B, respectivamente. A esta concentración elevada la FBZ tampoco amplificó el efecto inhibitorio de la NIF sola pues los valores de  $E_{max}$  en la aorta ( $118 \pm 1.5$ ,  $80 \pm 1.2^*$ ,  $84 \pm 2.4^*$  y  $44 \pm 0.6^{**}$ , para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $100\text{nM}$  y FBZ  $100\text{nM} + \text{NIF } 1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $p < 0.05$  vs control,  $**p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF) y en la arteria caudal ( $115 \pm 0.8$ ,  $100 \pm 1.4^*$ ,  $98 \pm 1.2^*$  y  $73 \pm 1^{**}$ , para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $100\text{nM}$  y FBZ  $100\text{nM} + \text{NIF } 1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $p < 0.05$  vs. control,  $**p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF) reflejan una sumatoria de los efectos de los fármacos individuales. La misma conclusión puede establecerse al observar los valores de potencia ( $CE_{50}$ ) tanto en la aorta ( $6.6 \pm 0.04$ ,  $6.3 \pm 0.04^*$ ,  $6.1 \pm 0.07^*$  y  $5.8 \pm 0.03^{**}$ , para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $100\text{nM}$  y FBZ  $100\text{nM} + \text{NIF } 1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. Control,  $**p < 0.05$  FBZ+NIF vs. NIF) como en la arteria caudal ( $6.5 \pm 0.02$ ,  $5.9 \pm 0.03^*$ ,  $6.1 \pm 0.03^*$  y  $5.7 \pm 0.03$ , para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , FBZ  $100\text{nM}$  y FBZ  $100\text{nM} + \text{NIF } 1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ,  $*p < 0.05$  vs. Control).

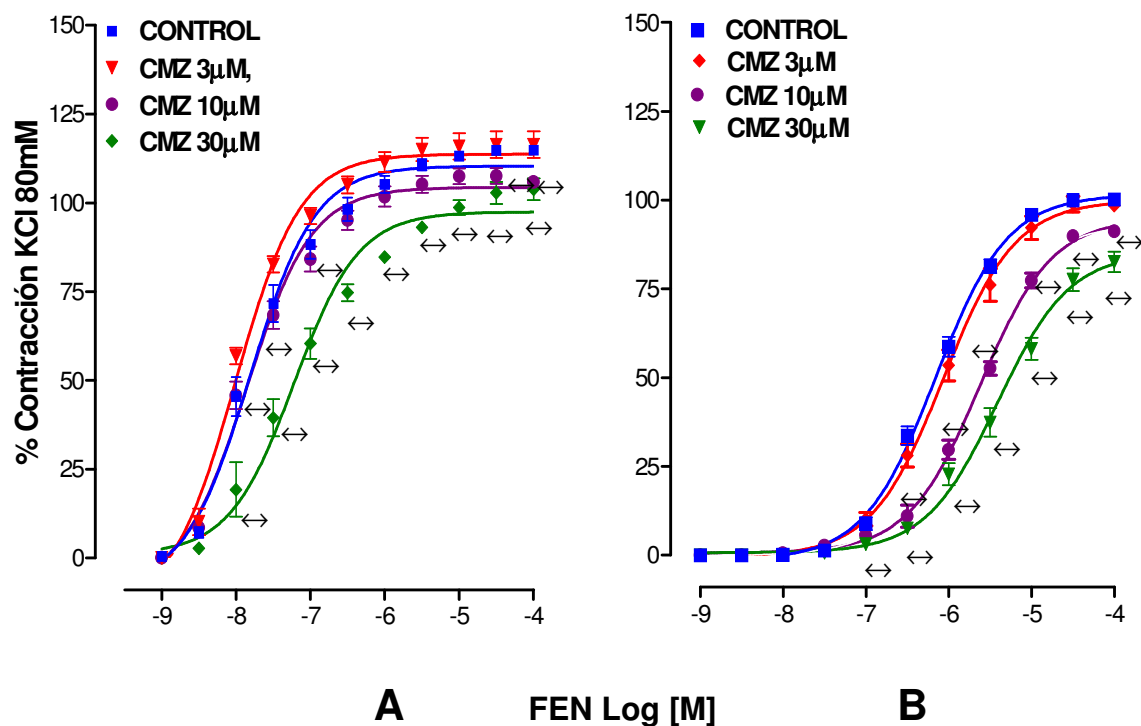


**A**                      **FEN Log [M]**                      **B**

**Figura 10.** Efecto de fenoxibenzamina (FBZ; 100nM) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl) 80mM. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 5 observaciones, \*p<0.05 vs.Control, \*p<0.05 FBZ+NIF vs. NIF.

**Efecto del CMZ sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la FEN en la aorta y la arteria caudal.**

El efecto del antagonista selectivo de la calmodulina, CMZ (3, 10 y 30 $\mu$ M), sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la fenilefrina (FEN) en anillos de aorta y arteria caudal se muestra en la Figura 11. Como se puede observar, el CMZ produjo una inhibición moderada, pero significativa, de la respuesta contráctil a la FEN en ambas preparaciones. Este efecto se visualizó como una depresión progresiva del  $E_{max}$  a la FEN en la aorta (110 $\pm$ 2.1, 114 $\pm$ 1.9, 104 $\pm$ 1.8 y 97 $\pm$ 2.6\*, para el control y CMZ 3, 10 y 30 $\mu$ M, respectivamente; n=4-5, \*p<0.05 vs. Control) y la arteria caudal (102  $\pm$  0.5, 100  $\pm$  0.8, 95  $\pm$  1 y 85  $\pm$  2\*, para el control y CMZ 3, 10 y 30 $\mu$ M, respectivamente; n=4-5, \*p<0.05 vs. control), así como un incremento progresivo de la  $CE_{50}$  en la aorta (7.8 $\pm$ 0.08, 8 $\pm$ 0.07, 7.9 $\pm$ 0.07 y 7.2 $\pm$  0.09\*, para el control y CMZ 3, 10 y 30 $\mu$ M, respectivamente; n=4-5, \*p<0.05 vs. control) y la arteria caudal (6.2 $\pm$ 0.01, 6.1 $\pm$ 0.02, 5.6 $\pm$ 0.02\* y 5.4 $\pm$ 0.05\*, para el control y CMZ 3, 10 y 30 $\mu$ M, respectivamente; n=4-5, \*p<0.05 vs. control). La concentración más baja de CMZ (3 $\mu$ M) produjo un leve desplazamiento hacia la izquierda de la curva C-R a la FEN en la aorta (Figura 11A).

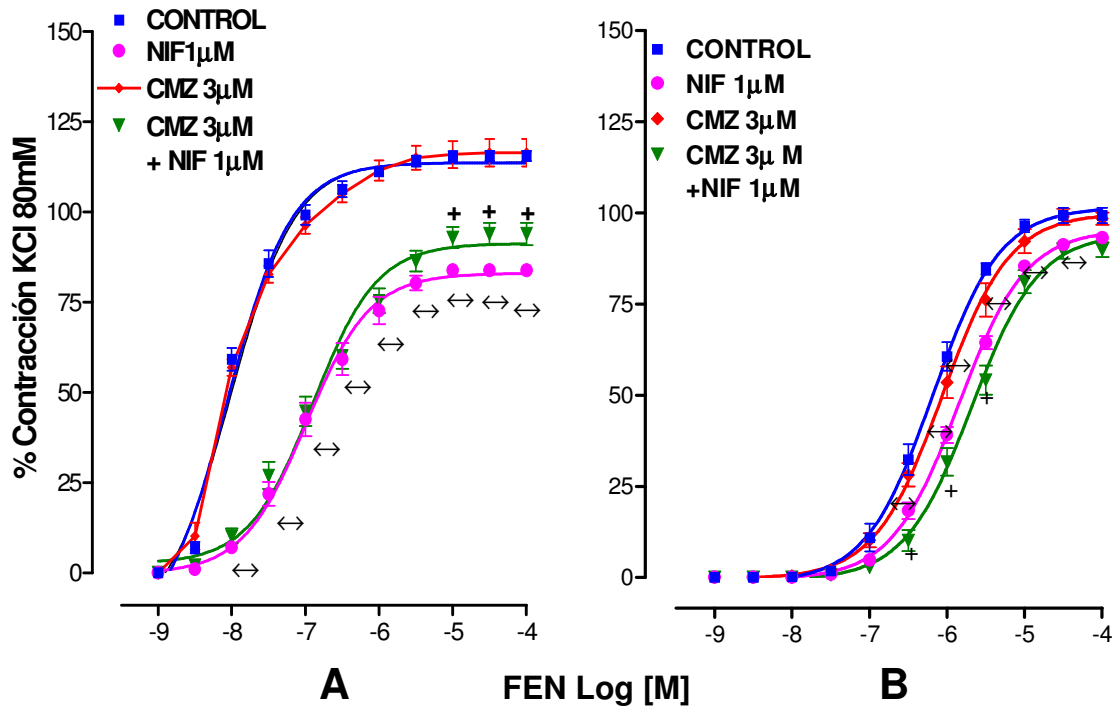


**Figura 11.** Efecto de concentraciones crecientes de calmidazolium (CMZ) sobre la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 4-5 observaciones. \* $p < 0.05$  vs. control.

**Efecto del tratamiento combinado de CMZ con NIF sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por FEN en la aorta y la arteria caudal.**

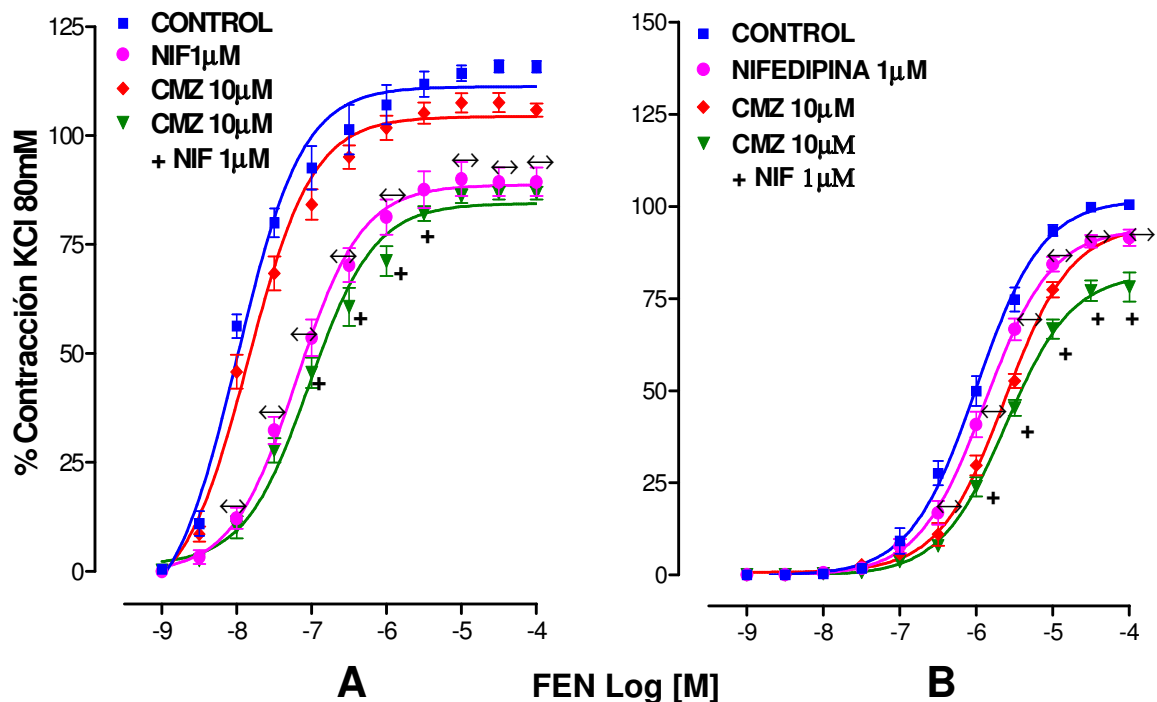
El efecto del CMZ, a las concentraciones de 3, 10 y 30μM, sobre la capacidad de la NIF para inhibir la respuesta contráctil a la FEN en la aorta y arteria caudal se muestra en las Figuras 12, 13 y 14, respectivamente. La concentración menor de CMZ (3μM) no amplificó el efecto inhibitorio de la NIF sobre la contracción a la FEN en ambas preparaciones (Figura 12A y 12B), pues los valores de  $E_{max}$  no cambiaron

significativamente ni en la aorta ( $114 \pm 2$ ,  $83 \pm 1^*$ ,  $114 \pm 1.9$  y  $91 \pm 2.3$ , para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , CMZ  $3 \mu\text{M}$  y CMZ  $3 \mu\text{M}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=4$  \* $p < 0.05$  vs. control) ni en la arteria caudal ( $102 \pm 0.70$ ,  $95 \pm 0.80$ ,  $100 \pm 0.80$  y  $94 \pm 1.5$  para el control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , CMZ  $3 \mu\text{M}$  y CMZ  $3 \mu\text{M}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=5$ ). En cuanto al efecto sobre la  $CE_{50}$ , tampoco se observaron cambios ni la aorta ( $8 \pm 0.08$ ,  $7 \pm 0.40^*$ ,  $8 \pm 0.08$  y  $6.9 \pm 0.08$  para control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , CMZ  $3 \mu\text{M}$  y CMZ  $3 \mu\text{M}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=4$ , \* $p < 0.05$  vs control) ni en la caudal ( $6.2 \pm 0.02$ ,  $5.9 \pm 0.02^*$ ,  $6 \pm 0.02$  y  $5.7 \pm 0.03$  para control, NIF  $1 \mu\text{M}$ , CMZ  $3 \mu\text{M}$  y CMZ  $3 \mu\text{M}$  + NIF  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente;  $n=4$ , \* $p < 0.05$  vs control).



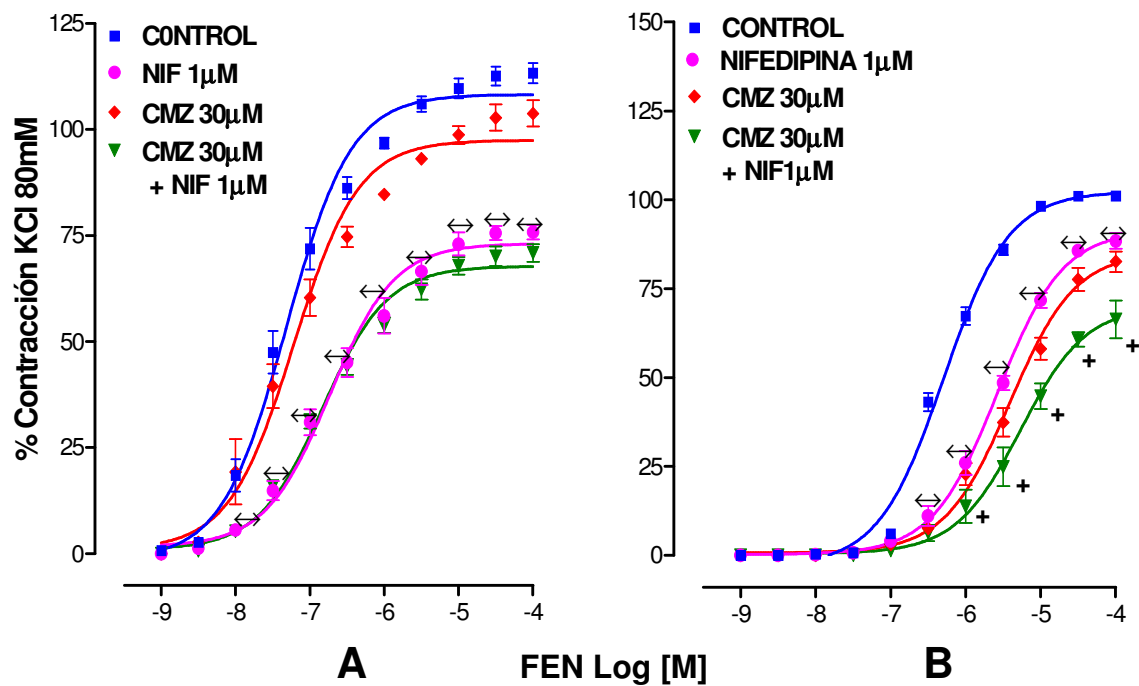
**Figura 12.** Efecto del calmidazolium (CMZ;  $3 \mu\text{M}$ ) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl) 80mM. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 4-5 observaciones \* $p < 0.05$  vs. Control, \* $p < 0.05$  <CMZ+NIF vs. NIF.

Con respecto de la concentración de 10 $\mu$ M de CMZ, tampoco se observó un efecto amplificador sobre el efecto inhibitorio de la NIF (Figura 13A y 13B) pues los valores de  $E_{max}$  no cambiaron significativamente en la aorta (111 $\pm$ 2.2, 89 $\pm$ 1\*, 104 $\pm$ 1.8 y 84 $\pm$ 1.8 para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 10  $\mu$ M y CMZ 10 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=5, \*p<0.05 vs control) o en la arteria caudal (102 $\pm$ 1.1, 94 $\pm$ 0.63, 95 $\pm$ 1.03 y 82 $\pm$ 0.79 para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 10 $\mu$ M y CMZ 10 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=5). El tratamiento combinado tampoco produjo efectos significativos sobre los valores de la  $CE_{50}$  en la aorta (8 $\pm$ 0.09, 7.2 $\pm$ 0.04\*, 7.9 $\pm$ 0.07 y 7 $\pm$ 0.07 para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 10 $\mu$ M y CMZ 10 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=5, \*p<0.05 vs control) o en la arteria caudal (6 $\pm$ 0.03, 5.9 $\pm$ 0.02 y 5.6 $\pm$ 0.02\*, 5.6 $\pm$  0.02\*\*) para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 10 $\mu$ M y CMZ10  $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=5, \*p<0.05 vs.Control, \*\*p<0.05 CMZ+NIF vs. NIF).



**Figura 13.** Efecto del calmidazolium (CMZ; 10 $\mu$ M) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl) 80mM. Los puntos representan la media y las barras verticales el error estándar de la media (n=5) \*p<0.05 vs.Control, †p<0.05 <CMZ+NIF vs. NIF.

Finalmente, el CMZ a una concentración de 30 $\mu$ M no amplificó el efecto inhibitorio de la NIF ni en la aorta ni en la caudal (Figura 14A y 14B, respectivamente). En concordancia con esto, los valores de E<sub>max</sub> en aorta (108 $\pm$ 2.2, 73 $\pm$ 1.8\*, 97 $\pm$ 2.6 y 68 $\pm$ 1.6 para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 30 $\mu$ M y CMZ 30 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=4, \*p<0.05 vs control) y en la arteria caudal (102 $\pm$ 2.3, 91 $\pm$ 1, 85 $\pm$ 2\* y 70 $\pm$ 1\*\* para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 30 $\mu$ M y CMZ 30 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=4, \*p<0.05 vs control, \*\*p<0.05 CMZ+NIF vs. NIF) no fueron modificados significativamente por el tratamiento combinado. Asimismo, los valores de CE<sub>50</sub> tampoco se vieron alterados por el tratamiento combinado ni en la aorta (7.3 $\pm$ 0.07, 6.8 $\pm$ 0.08\*, 7.2 $\pm$ 0.1 y 6.8 $\pm$ 0.08 para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 30 $\mu$ M y CMZ 30 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=4, \*p<0.05 vs control) ni en la arteria caudal (6.3 $\pm$ 0.06, 5.6 $\pm$ 0.02\*, 5.4 $\pm$ 0.05\*, 5.3 $\pm$ 0.04\*\* para el control, NIF 1 $\mu$ M, CMZ 30 $\mu$ M y CMZ 30 $\mu$ M + NIF1 $\mu$ M, respectivamente; n=4, \*p<0.05 vs.Control, \*\*p<0.05 \*p<0.05 vs.Control, †p<0.05 <CMZ+NIF vs. NIF CMZ+NIF vs. NIF).



**Figura 14.** Efecto del calmidazolium (CMZ; 30 µM) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina (FEN) en anillos sin endotelio de aorta (A) y de arteria caudal de rata (B). Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción a cloruro de potasio (KCl) 80mM. Los puntos representan la media y las barras verticales el error estándar de la media (n=4).



## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio con el antagonista irreversible de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y de calmodulina, FBZ, se encuentran en discrepancia con los reportados por otros autores en el sentido de que la FBZ no ejerció efectos amplificadores de la acción inhibitoria de la NIF sobre la contracción inducida por la FEN en la aorta y la arteria caudal de la rata, la cual es mediada por los receptores  $\alpha_{1D}$ - y  $\alpha_{1A}$ - adrenérgicos, respectivamente.

Uno de los argumentos para considerar un mecanismo alterno a la alquilación de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en la acción amplificadora de la FBZ sobre el efecto inhibitorio de la NIF, se basa en el hecho de que la FBZ es más potente para amplificar los efectos inhibitorios de la NIF que para bloquear las respuestas presoras  $\alpha$ 1-adrenérgicas en la rata descerebrada y desmedulada (Holck, 1988; Ruffolo y col., 1984; Timmermans y col., 1985,1987). Dada la capacidad de la FBZ para unirse irreversiblemente a la calmodulina (Earl y col.,1984), resulta razonable suponer que las citadas propiedades amplificadoras de la FBZ sobre el efecto de NIF se expliquen por la inhibición irreversible de esta proteína. Nuestros resultados no apoyan esta hipótesis y, de hecho, cuestionan los resultados de otros investigadores. No obstante, como lo demuestran otros resultados recientes en nuestro laboratorio, parece que la manifestación del citado fenómeno de amplificación por la FBZ y el CMZ depende del agonista que se utilice y/o de las condiciones experimentales.

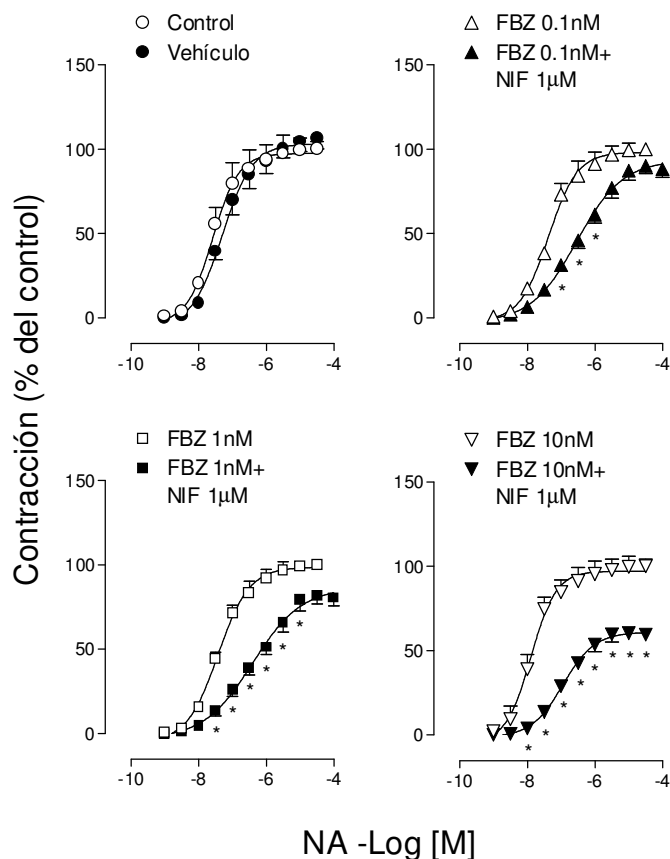
## **Papel de la calmodulina en la contracción $\alpha$ 1-adrenérgica de la aorta y la arteria caudal de la rata.**

El número de estudios referentes al efecto de fármacos antagonistas de la calmodulina sobre la contracción vascular mediada por receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos es muy limitado. Por lo tanto, parte de nuestro interés en este proyecto fue el de analizar el efecto de la inhibición farmacológica de la dicha proteína sobre la contracción vascular mediada por los receptores  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$  adrenérgicos. Como se puede observar, la respuesta contráctil en la aorta y en la arteria caudal se afecta de manera diferencial con la FBZ pues ésta produce una mayor inhibición de la respuesta contráctil en la aorta que en la arteria caudal. De interés particular es el hecho de que la concentración menor de FBZ (1nM) produjo un desplazamiento significativo de la curva C-R a la FEN en la arteria caudal (i.e. una potenciación) pero no en la aorta. La razón de esta diferencia en las dos preparaciones es desconocida pero representa un fenómeno que requerirá un análisis posterior. Por otro lado, en vista de que los experimentos se realizaron bajo condiciones de protección de los receptores  $\alpha_{1D}$  (con BMY en la aorta) y  $\alpha_{1A}$  (con 5-MU en la arteria caudal), es probable que el efecto inhibitorio de la FBZ sea debido, al menos en parte, a la inhibición de la calmodulina con la cual la FBZ se une de manera irreversible (Earl y col., 1984). En apoyo de la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la FBZ sobre la contracción sea debido en parte a la inhibición de la calmodulina, la concentración más elevada de CMZ produjo una inhibición significativa de la respuesta contráctil a la FEN en ambas preparaciones. Estas observaciones, por lo tanto, sugieren que la calmodulina se encuentra involucrada en el proceso de contracción debido a la activación de los receptores  $\alpha_{1D}$ - y  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos.

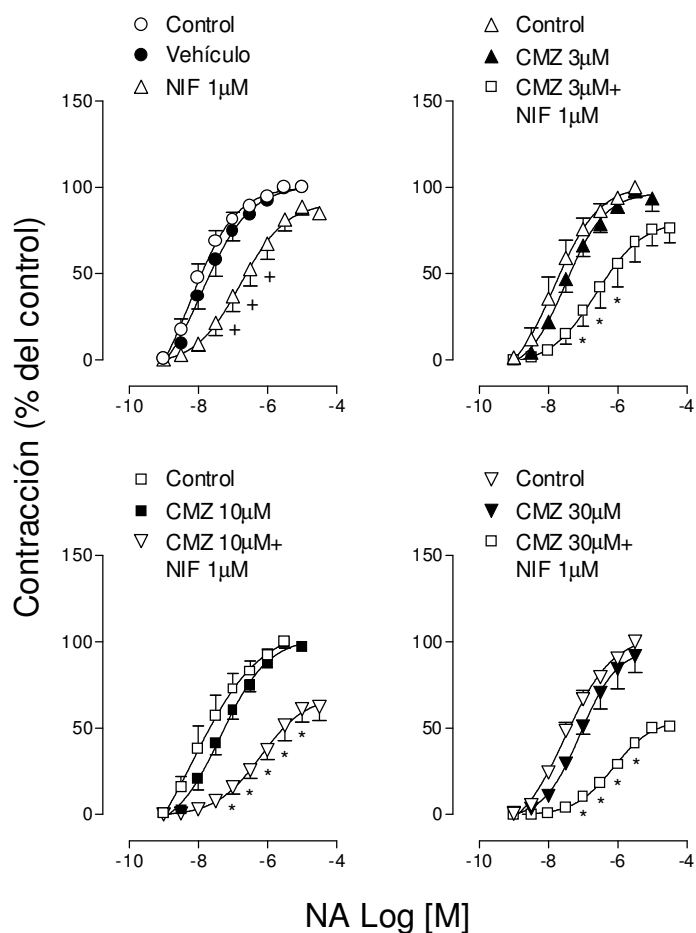
## Efecto de la FBZ y del CMZ sobre la capacidad de la NIF para inhibir la contracción en la aorta y la arteria caudal.

Los resultados del presente estudio indican que la FBZ y el CMZ no son capaces de amplificar el efecto inhibitorio de la NIF sobre la contracción inducida por la FEN en la aorta y arteria caudal de la rata. No obstante, considerando la posibilidad de que el fenómeno sea dependiente de las condiciones experimentales y/o del agonista que se emplea, se realizaron experimentos en el laboratorio -independientes de este trabajo- destinados a investigar si la FBZ y el CMZ podrían amplificar el efecto inhibitorio de la NIF sobre la contracción inducida por la NA en anillos sin endotelio de aorta de rata. Los resultados demostraron que tanto la FBZ (Figura 15) como el CMZ (Figura 16) fueron capaces de amplificar el efecto inhibitorio de la NA de manera dependiente de la concentración.

**Figura 15.** Efecto de la fenoxibenzamina (FBZ 0.1, 1 y 10 nM) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la noradrenalina (NA) en anillos sin endotelio de aorta de rata. Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción obtenida en las preparaciones control. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 3 observaciones.



**Figura 16.** Efecto del calmidazolium (CMZ; 3, 10 y 30 $\mu$ M) sobre la capacidad de la nifedipina (NIF) para inhibir la respuesta contráctil inducida por la noradrenalina (NA) en anillos sin endotelio de aorta de rata. Los cambios de tensión están expresados como porcentaje de la contracción obtenida en las preparaciones control. Los puntos representan la media y las barras verticales denotan el error estándar de la media de 3 observaciones.



Vale la pena destacar que las condiciones utilizadas en estos experimentos fueron distintas a las empleadas en los experimentos con FEN (trabajo presente), pues en cada preparación se realizaron de dos a tres curvas C-R a la NA, tomándose como control la primera curva y sin provocar contracciones a KCl 80 mM.

Tomando en consideración estos datos con NA, los resultados de nuestro trabajo sugieren que el fenómeno de amplificación del efecto inhibitorio de NIF por FBZ y CMZ depende del agonista que se utilice para estimular los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y/o de las condiciones experimentales. Estas observaciones dan soporte al concepto de que las vías de señalización involucradas en el proceso de

activación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos no participan en la misma medida cuando se emplean agonistas distintos; hipotéticamente, esto parece extenderse al papel de la calmodulina tanto en la contracción (nótese que el CMZ no bloqueó la respuesta contráctil a la NA) como en la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  en el músculo liso vascular (véase más adelante).

### **Mecanismos propuestos en la acción amplificadora de la FBZ.**

Como ya se ha explicado, la contracción vascular mediada por la activación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos implica dos mecanismos fundamentales de manejo del ión  $\text{Ca}^{++}$ . El primero de ellos comprende principalmente la generación de segundos mensajeros a partir de los fosfolípidos constituyentes de la membrana, entre los que destaca el  $\text{IP}_3$ , y la consecuente liberación de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico (véanse antecedentes generales). El segundo mecanismo incluye la apertura de canales de  $\text{Ca}^{++}$  sensibles a las dihidropiridinas. Se ha propuesto que el primer mecanismo opera de manera predominante en el caso de la contracción vascular inducida por agonistas  $\alpha$ 1-adrenérgicos completos, mientras que el segundo lo hace cuando las respuestas son inducidas por agonistas  $\alpha$ 1-adrenérgicos parciales (Oriowo y col., 1992), y que el hecho de que la FBZ amplifique el efecto inhibitorio de la NIF sobre las respuestas vasoconstrictoras  $\alpha$ 1-adrenérgicas se debe a que el agente alquilante inhibe selectivamente el proceso de contracción que involucra la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Timmermans y col., 1985; Ruffolo y Nichols, 1988; Ruffolo y col., 1984). Esta hipótesis se vio favorecida por el hallazgo de que la FBZ facilita en mayor medida el efecto inhibitorio de la NIF sobre las respuestas vasoconstrictoras  $\alpha$ -

adrenérgicas que dependen mayormente del influjo de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, tales como aquellas inducidas por agonistas parciales  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Ruffolo y col., 1984; Timmermans y col., 1985). Adicionalmente, con base en los efectos diferenciales de agentes bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  sobre la vasoconstricción inducida por diversos agonistas  $\alpha$ 1-adrenérgicos, se había propuesto la existencia de dos subtipos distintos del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico uno de los cuales estaría acoplado al mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, mientras que el otro lo haría con el mecanismo que depende del influjo de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular (Holk y col., 1983). Mediante en análisis del efecto de antagonistas de estructura química diversa contra las respuestas presoras inducidas por un agonista completo y uno parcial  $\alpha$ 1-adrenérgico (Korstanje y col., 1984), con experimentos clásicos de protección del efecto alquilante de la FBZ con NA y el agonista parcial  $\alpha$ 1-adrenérgico, dobutamina (Oriowo y col., 1992), se demostró que un solo receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico puede estar acoplado a los dos mecanismos de movilización del  $\text{Ca}^{++}$ .

Tomadas de manera conjunta, las observaciones anteriores no permiten llegar a una conclusión en torno al mecanismo preciso mediante el cual la FBZ facilita el efecto inhibitorio de la NIF sobre las respuestas vasoconstrictoras mediadas por la activación de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Sin embargo, como se discute más abajo y en concordancia con los datos obtenidos con CMZ, el mecanismo más factible parece involucrar la inhibición de la calmodulina.

### **Papel de la calmodulina en la modulación de los canales de Ca<sup>++</sup>.**

Diversas evidencias han demostrado que los canales de Ca<sup>++</sup> tipo L tienen la propiedad de regularse a sí mismos a través de su propia actividad por medio de mecanismos de inactivación y facilitación (McDonald y col., 1994). Tales mecanismos involucran procesos de fosforilación vía la participación de proteínas cinasas específicas inhibitorias como la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico y la dependiente de GMP cíclico (Xiong y Sperelakis, 1995). Asimismo, la activación de la PKC por el segundo mensajero DAG puede dar lugar a la fosforilación del canal (en un sitio distinto de aquel utilizado por las cinasas inhibitorias) lo cual conlleva a su activación (Xiong y Sperelakis, 1995).

Entre los mecanismos propuestos para explicar la naturaleza de los fenómenos de inhibición y facilitación de los canales de Ca<sup>++</sup> tipo L, se ha implicado la participación de la calmodulina (Gurney y col., 1989; McDonald y col., 1994). En este sentido, desde un punto de vista molecular, se ha reportado la existencia de un sitio de unión al Ca<sup>++</sup> denominado "EF", el cual se encuentra situado a un lado de un sitio de unión a calmodulina conformado por los aminoácidos isoleucina y glutamina, al que se le ha denominado "IQ". Ambos sitios se encuentran localizados hacia el final de la secuencia carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha 1C$  del canal (Peterson y col., 1999; Zühlke y col., 1999). Resultados recientes sugieren que la calmodulina desempeña un papel clave como sensor del Ca<sup>++</sup> durante el proceso de inactivación del canal (Peterson y col., 1999).

### **Inhibición de calmodulina como posible mecanismo en la acción amplificadora de la FBZ y el CMZ.**

Considerando el hecho de que la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos vasculares dispara un proceso de contracción que utiliza  $\text{Ca}^{++}$  de fuentes extracelulares e intracelulares (Timmermans y col., 1985), podría contemplarse la posibilidad de que la inhibición de la calmodulina pudiera inhibir también el proceso de inactivación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de canales tipo L (Peterson y col., 1999), y que un mecanismo facilitador independiente de calmodulina que requiera solamente un aumento de los niveles de calcio intracelular se vea favorecido. Esta posibilidad es consistente con reportes previos que demuestran que el proceso de facilitación disparado por una carga de  $\text{Ca}^{++}$  puede operar sin fosforilación de proteínas (Yamaoka y Seyama, 1996) lo cual excluiría la participación de la calmodulina. Con base en esta información, parece razonable suponer que la inhibición de la calmodulina mediante la acción de agentes farmacológicos, como la FBZ y el CMZ, puede inhibir el proceso de inactivación del canal, dando como resultado un fenómeno de facilitación del mismo. Esto se vería reflejado como un fenómeno de amplificación de los efectos inhibitorios de los agentes bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  como la NIF.



## CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo, aunados a resultados posteriores de nuestro laboratorio, sugieren que la inhibición farmacológica de la calmodulina facilita los efectos inhibitorios que la NIF ejerce sobre el proceso de contracción vascular mediado por los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en la aorta. Desde luego, se requiere investigación adicional para determinar que es lo que sucede en la arteria caudal y en otras preparaciones vasculares. Este fenómeno de facilitación, sin embargo, parece expresarse funcionalmente de acuerdo con el agonista empleado pues no se observó con la FEN pero sí con NA. El mecanismo probablemente responsable de dicho fenómeno puede involucrar la expresión de un proceso de facilitación del canal de  $\text{Ca}^{++}$  (lo cual explica la mayor susceptibilidad a la NIF) pues existe evidencia de que el proceso de inhibición del mismo requiere la participación de la calmodulina. De acuerdo con esta posibilidad, la inhibición de la calmodulina puede abolir a su vez este proceso inhibitorio del canal.

## **RECOMENDACIONES**

Son necesarios la realización de experimentos adicionales para determinar en que medida participa la calmodulina en la contracción vascular producida por agonistas con diversos grados de eficacia (agonistas completos y parciales), así como la susceptibilidad de modulación de los canales de  $Ca^{++}$  en la contracción inducida por dichos agentes.

## REFERENCIAS

- Alvárez-Guerra M., Bertholom N. and Garay RP. (1999). Selective blockade by nicergoline of vascular responses elicited by stimulation of alpha 1<sub>A</sub>-adrenoceptor subtype in the rat. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 50.
- Asano M. and Hidaka H. (1985). Pharmacological properties of N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide (W-7), a calmodulina antagonist in arterial strips from rats and rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 234, 476-484.
- Asano M., Masuzawa K., Kojima M., Aoki K. and Matsuda T. (1988). Comparison of inhibitory effects of calcium channel blockers and that of a calmodulina antagonist in strips of mesenteric arteries from spontaneous hypertensive and normotensive rats. *J. Pharmacol.*, 48, 77-90.
- Bognar IT. and Enero MA. (1988). Influence of a receptor reserve on the inhibition by calcium channel blockers of alpha adrenoceptor-mediated responses in rat isolated vascular tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245, 673-681.
- Buckner, S.A., Oheim KW., Morse PA., Knepper SM., and Hancock AA. (1996).  $\alpha_1$ -adrenoceptor induced contractility in rat aorta is mediated by the  $\alpha_{1D}$  subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 297,241-248.
- Bylund DB. (1992). Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J.*, 6, 832-839.
- Bylund DB., Eikenberg DC., Hieble JP., Langer SZ., Lefkowitz RJ., Minneman KP., Molinoff PB., Ruffolo RR. Jr and Trendelenburg U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, 46, 121-136.
- Campebell, J.K., Winslow E. and Marshall RJ. (1986). The effects of bepridil, compared with calcium-channel inhibitors and calmodulin antagonists on both spontaneous activity and contractions induced potassium or phenylefrine in rat portal vein. *Eur. J. Pharmacol.* 132, 1987-196.
- Castillo EF., López RM, Rodríguez JS, Bobadilla RA., and Castillo C. (1998).  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors contribute to the neurogenic vasopresor response in pithed rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 12, 584
- Catterall WA., Seagar MJ., Takahashi M., Nunoki K. (1989). Molecular properties of dihydropiridine - sensitive calcium channels. *Ann N Y Acad Sci.*, 560, 1-14.

- Cheung, WY. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*. 207, 19-27
- Cimino M. and Weis B. (1988). Characteristic of the binding of phenoxybenzamine to calmodulin. *Biochemical Pharmacology*, 37, 2739-2745.
- Earl CQ, Prozialeck WC & Weiss B. (1984). Interaction of alpha adrenergic antagonists with calmodulin. *Life Sci.*, 35, 525
- Elliott MR. (1995). Pharmacodynamics. Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. in Godman & Gilman: *The pharmacological basis of therapeutics* (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Gilman AG eds) 9<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, pp 29-41.
- Flavahan NA. and Vanhoutte, PM. (1986).  $\alpha_1$ -adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 347-349.
- Furchgott RF. and Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, 373-390.
- García-Sáinz J.A., Vázquez-prado J, and Medina LC. (2000).  $\alpha_1$ -adrenoceptors function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.*, 389, 1-12.
- Glossmann H, Ferry DR et al. (1983). Identification of voltage operated calcium channels by binding studies: differentiation of subclasses of calcium antagonists drugs with 3H-nimodipine radioligand binding. *J Receptor Res.*, 3, 177-90.
- Graham RM., Pérez DM., Hwa J. and Piascik MT. (1996). Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ. Res.*, 78, 737-749.
- Guimaraes S and Moura D. (2001). Vascular adrenoceptors: An Update. *Pharmacol. Rev.*, 53, 319-356.
- Gurney AM., Charnet P., Dye and Nargeat JM. (1989). Of cardiac calcium current by flash photolysis of intracellular caged  $Ca^{++}$  molecules. *Nature*. 344, 65-68.
- Han C., Abel PW. and Minneman KP. 1987. Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in rat blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.*, 190, 97-104.
- Hancock AA. (1996).  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes: a synopsis of their pharmacology and molecular biology. *Drugs Development Rev.*, 39, 54-107.
- Hardman JG. and Limbird (Eds), *Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill. New York, pp 781-808.

- Hein L. and Kobilka B.K. (1995). Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology*. 34,357-366.
- Hidaka, H., Asano HM and Tonaka T, 1981. Activity structure relationship of calmodulin antagonists: naphtalenesulfonamide derivates. *Mol. Pharmacol.*, 20, 571.
- Hoffman BB. y Lefkowitz RJ. (1996). Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. En Goodman & Gilman *las bases farmacológicas de la terapéutica*, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, octava edición en español, McGraw-Hill interamericana, México. pp.211-264
- Holck ML. (1988).  $\alpha_1$ -adrenoceptors reserve and effects of a  $Ca^{2+}$  entry blocker (Ro 18-3981) on aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.*, 148, 9-15.
- Holck MI., Jones CHM., Haeuster G. (1983). Differential interactions of clonidine and methoxamine with the postsynaptic  $\alpha$ -adrenoceptor of rabbit main pulmonary artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5, 240-248.
- Ibarra M., Pardo JP., López-Guerrero JJ. and Villalobos-Molina R. (2000). Differential response to cloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats, role of  $\alpha_{1D}$  and  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in contraction. *Br. J. Pharmacol.* 129, 653-660.
- Ibarra M., Terrón JA., López-Guerrero JJ. and Villalobos-Molina R. (1997). Evidence for an age dependent functional expresión of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur. J. Pharmacol.*, 322,221-224.
- Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC. and Naylor AM. (1995). Characterisation of an  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J. Pharmacol.*, 115,981-986.
- Korstanje C, Ten Brink EMJ and Van Zwieten PA. (1988). Interaction of calmodulin antagonists with  $\alpha$ -adrenergic responses in pithed rats and in the perfused hindquarters of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 148, 59-67.
- Korstanje C., Wilffer B., De Jonge A., Thoolen MJMC., Timmermans PBMWM. and Van Zwieten PA. 1982. (1984). Calcium influx dependent and independent  $\alpha_1$ -

- adrenoceptor mediated processes of vasoconstriction in vivo do not operate via different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6, 1102-1108.
- Langer SZ. and Hicks PE. (1984). Alpha-adrenoceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6, 547-556.
- Lefkowitz JR., Hoffman BB and Taylor P. (1995). Neurotransmission. The autonomic and somatic motor nervous systems in Godman & Gilman: *the pharmacological basis of therapeutics* (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Gilman AG) 9<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York. pp105-139.
- Lehninger, AL., Nelson DL and Cox MM. (1995) *Principios de bioquímica* 2a. ed. Ed. Omega, Barcelona. pp 763-774.
- McDonald TF., Pelzer S., Trautwein W. and Pelzer DJ. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac skeletal and muscle cells. *Physiol. Rev.* 74, 365-507.
- McGrath JC. (1982). Evidence for more than one type of postjunctional alpha-adrenoceptor. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 467-484.
- Minneman KP. (1988).  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and source of cell calcium. *Pharmacol. Rev.*, 40, 87-119.
- Oates JA. (1996). Antihypertensive agent and drug therapy of hypertension. En Hardman JG. and Limbird (Eds), *Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill. New York, pp 781-808.
- Oriowo MA. and Ruffolo RR. (1992). Heterogeneity of postjunctional  $\alpha_1$ -adrenoceptors in mammalian aorta: subclassification based on chloroethylclonidine, WB 4101 and Nifedipine. *J. Vas. Res.*, 29, 33-40.
- Peterson BZ., De Maria CD. and Yue DT. (1999). Calmodulin is the  $Ca^{++}$  sensor for  $Ca^{++}$  dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron.* 22, 549-558.
- Price DT. Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D, Schwinn DA. (1994). Localizations of mRNA for three distinct  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.*, 45, 171.
- Robertson RM. and Roberson D. (1996). Drugs used for the treatment of myocardial ischemia. En Hardman JG. and Limbird (Eds), *Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill. New York, pp 759-780.

- Ruffolo RR, EL Morgan and K Messick. (1984). Possible relationship between receptor reserve and the differential antagonism of alpha-1 alpha-2 adrenoceptor mediated pressor responses by calcium channel antagonists in the pithed rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230,587-594.
- Ruffolo RR. Jr. and Nichols AJ. (1988) . the relationship of receptor reserve and agonist efficacy to the sensitive of  $\alpha$ -adrenoceptor mediated vasopressor response to inhibition by calcium channels antagonists. *Ann NY. Acad. Sci.*, 522, 361-376.
- Sanguinetti MC. and Kass R. (1984). Voltage dependent block of calcium channel current in the calf cardiac purkinge fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Cir Res.*, 55, 336-48.
- Terrón JA., Ransanz V., Ibarra M., Hong E. and Villalón CM. 1992. alpha  $\alpha_1$ -adrenoceptor blocking properties of spiroxatrine in rat aorta. *Life Sci.*, 51, 1-6.
- Timmermans PBMWM and MJMC Thoolen. (1987). Equal potency of nifedipine to inhibit  $\alpha_1$ -(dobutamine and BDF 6143) and  $\alpha_2$ . adrenoceptor (B-HT 9209) induced pressor responses in pithed rats; lack of effect of phenoxybenzamine. *J. Pharmacology.* 140,133-142.
- Timmermans PBMWM, MJMC Thoolen, MJ Mathy, B, Wilffert, A de Jonge and PA van Zwieten. (1985). Effects of the irreversible  $\alpha_2$ . adrenoceptor antagonists phenoxybenzamine and benextramine on the effectiveness of nifedipine in  $\alpha_1$ . and  $\alpha_2$  –adrenoceptor mediated vasoconstriction in pithed rats. *Naunyn-Schmiedeberg´s Arch. Pharmacol.*, 329, 404-413.
- Timmermans PBMWM. and van Zwieten PA. (1982). Alpha-2 adrenoceptors classification, mechanisms and targets for drugs. *J. Med. Chem.*, 25,1389-1401.
- Van Belle H. (1981). R24571: a potent inhibitor of calmodulin activated enzymes. *Cell Calcium.* 2, 483-494.
- Van Bremen C, Leijten P, Yamamoto H, Aaronson P, Cauvin C. (1986). Calcium Activation of vascular smooth muscle. State of the art lecture. *Hypertension* 8,89.
- Varma DR. and Deng XF. (2000). Cardiovascular  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor subtypes: functions and signaling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 78, 267-292.

- Vázquez-Prado J and García-Sainz JA. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 50, 17-22.
- Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ and Ibarra M. (1999). Functional evidence of  $\alpha_1$ -adrenoceptor in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.*, 13, 717-721.
- Villalobos-Molina R., Ibarra M. (1996).  $\alpha_1$ -adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha_{1D}$  or  $\alpha_{1A}$  subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, 298, 257-263.
- Winslow E., Farmer S., Martorana M. and Marshall R.J., (1986). The effects of bepridil compared with calcium antagonist on rat rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 131, 219-228.
- Xion Z. and Sperelakis N. (1995). Regulation of L- type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 75-91.
- Yajima T, Takeuchi T, Okada T, Yoshizaki H, Kuwahara T, Koyama K and Nakamura K. (1987). Spasmolytic action of the cerebral circulation improver 6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-4-[(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl] methyl) isoquinoline in isolated canine vessels. *Arzneimittelforschung*, 37, 498-502.
- Yamaoka K. and Seyama I. (1996). *Pflugers Arch.*, 431, 305
- Zhong H and Minemann KP. (1999).  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes. *Eur. J. Pharmacol* 375,261-276.
- Zhou L and Vargas HM. (1996). vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylefrine in the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 305,173-176.
- Zhu WZ, Kwan CY and Han C. (1998).  $Ca^{2+}$  dependence of vasoconstriction mediated by alpha 1<sub>A</sub>-adrenoceptors in perfused rat hindlimb: a pharmacological approach. *Life Sci.*, 63, 89-94.
- Zimmer M. and Hofmann F. (1984). Differentiation of the drug binding sites of calmodulin. *Eur. J. Pharmacol.* , 142,393.
- Zühlke, RD., Pitt GS., Deisseroth K., Tsien RW. and Reuter H. (1999). Calmodilin supports both inactivation and facilitation of I-type calcium channels. *Nature*, 399, 159-162.



