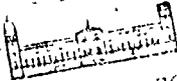


**ESTUDIO DEL FUNCIONALISMO DOPAMINÉRGICO EN EL
CEREBRO DE RATA TRAS LA ADMINISTRACION DE
FARMACOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA
Biblioteca
Àrea de Ciències de la Salut
CAMPUS DE BELLESGUARD

I N D I C E

1. INTRODUCCION	1
1.1. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	2
1.2. DOPAMINA	4
1.2.1. Biosíntesis. Regulación	5
1.2.2. Recambio	12
1.2.3. Almacenamiento	12
1.2.4. Liberación. Regulación	13
1.2.5. Metabolismo	17
1.2.6. Recaptación	19
1.3. SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	20
1.3.1. Sistemas dopaminérgicos mesoestriatal, mesolímbico y mesocortical	23
1.3.2. Sistemas dopaminérgicos diencefálicos	26
1.4. CALCIO Y FISILOGIA NEURONAL	28
1.4.1. Generalidades	28
1.4.2. Calcio y otros efectores bioquímicos en la regulación de la función celular	31
1.4.3. ATPasa calcio dependiente y sistema de intercambio Ca^{++} - Na^{+}	37
1.4.4. Calcio intracelular y su movilización	41
1.4.5. Fosforilación proteica regulada por calcio en el cerebro de mamíferos	44
1.4.6. Control por calcio de la liberación de neurotransmisores	49
1.4.7. Tipos de canales de calcio y su modulación selectiva	52
1.4.7.1. Generalidades	52
1.4.7.2. Heterogeneidad del canal de calcio	54
1.4.7.3. Regulación bioquímica de los canales de calcio	57
1.4.7.4. Bioquímica y biología molecular del canal de calcio sensible a dihidropiridinas	59

1.4.7.5. Distribución de centros de fijación de fármacos antagonistas de canales de calcio en el cerebro de rata	63
1.5. FARMACOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO	66
1.5.1. Generalidades	66
1.5.2. Propiedades farmacocinéticas	70
1.5.3. Aplicación clínica	73
2. MATERIALES Y METODOS	76
2.1. REACTIVOS. FARMACOS	76
2.2. TECNICAS UTILIZADAS	77
2.2.1. Exploración neuroquímica local in vivo en cerebro de animales	77
2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica	81
2.2.3. Actividad del enzima tirosina hidroxilasa	84
2.3. ANIMALES	84
2.4. ANESTESIA	85
2.5. IMPLANTACION ESTEREOTAXICA	85
2.6. PROCEDIMIENTO DE DIALISIS INTRACEREBRAL	86
2.7. TRATAMIENTOS	87
2.8. DISEÑO DE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS	88
2.8.1. Estandarización del método de microdiálisis intracerebral	88
2.8.2. Estudio de la función dopaminérgica en tejido estriatal y límbico tras la administración de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio. Efecto sobre la tirosina hidroxilasa	89
2.8.3. Estudio de la función dopaminérgica en tejido estriatal y límbico tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	90
2.8.4. Estudio de los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos en estriado después de una única administración de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	90

2.8.5. Estudio de los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos en estriado después de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	91
2.8.6. Estudio del efecto producido por la despolarización con potasio o por el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos en estriado tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	92
2.9. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	92
2.9.1. Por disección tisular	92
2.9.2. Por microdiálisis cerebral	93
2.10. ANALISIS ESTADISTICO	93
3. RESULTADOS	95
3.1. ESTANDARIZACION DEL MODELO EXPERIMENTAL DE MICRODIALISIS CEREBRAL EN RATAS	95
3.1.1. Evolución de los niveles basales de dopamina y sus metabolitos en líquido de perfusión estriatal obtenido tras varias horas continuadas de la misma	96
3.1.2. Repercusión de la implantación y perfusión sobre el contenido de aminas y metabolitos en tejido estriatal	97
3.1.3. Funcionalismo de la fibra de microdiálisis a lo largo de varios días de perfusión	97
3.2. ESTUDIO DEL FUNCIONALISMO DOPAMINERGICO TRAS LA ADMINISTRACION DE FARMACOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO	99
3.2.1. ESTUDIOS EN TEJIDO ESTRIATAL Y LIMBICO DE RATA	100
3.2.1.1. Efecto de la administración de una dosis elevada de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos y sobre la actividad de la tirosina hidroxilasa	100

3.2.1.2.	Efecto de la administración crónica de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos y sobre la actividad de la tirosina hidroxilasa	101
3.2.1.3.	Efecto de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos	107
3.2.2.	ESTUDIOS EN LIQUIDO EXTRACELULAR ESTRIATAL DE CEREBRO DE RATA	113
3.2.2.1.	Efecto de una única administración de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos	113
3.2.2.2.	Efecto de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos	118
3.2.2.3.	Efecto de la despolarización producida por potasio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	122
3.2.2.4.	Efecto de una administración de haloperidol sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos tras el tratamiento crónico con haloperidol o con dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio	132
4.	DISCUSION	148
5.	CONCLUSIONES	166
6.	BIBLIOGRAFIA.	

1. INTRODUCCION.

A lo largo de la última década se ha caracterizado un grupo de compuestos farmacológicos que comparten la propiedad biológica de disminuir la entrada de iones de calcio en varios tipos de células. Estas drogas han sido usadas extensamente en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares (hipertensión arterial y diversos tipos de angor y arritmias) y neurológicos (profilaxis de migraña, vértigo y vasospasmo cerebral secundario a hemorragia subaracnoidea). A pesar de la importancia de los iones de calcio en muchas funciones del sistema nervioso central, incluyendo la liberación de neurotransmisores, muchas de las propiedades neurofarmacológicas de los antagonistas de canales de calcio no han sido investigadas.

En los últimos años han aparecido trabajos basados en observaciones clínicas y datos experimentales que tratan de la existencia de una posible interferencia entre ciertos antagonistas de canales de calcio y la transmisión dopaminérgica.

Desde el punto de vista clínico se ha descrito que la flunaricina puede producir parkinsonismo, discinesia tardía, akatisia y depresión (Chouza y cols.,1986), que la cinaricina puede dar lugar a parkinsonismo y agravar la enfermedad de Parkinson (Martí Massó y cols.,1985; 1987) y que el verapamil causa hiperprolactinemia (Gluskin y cols.,1981).

Experimentos in vitro han mostrado una inhibición competitiva de la unión de [³H]spiperona a los receptores D₂ dopaminérgicos estriatales por la nicardipina, el verapamil, el D-600 (De Vries y Beart,1984) y la flunaricina (Govoni y cols.,1988a).

Estudios en animales de laboratorio indican que la

administración aguda de nimodipina reduce la síntesis de dopamina en el cerebro de ratón (Carlsson,1986; Pileblad y Carlsson,1987) y la nifedipina y la flunaricina bloquean la estimulación de la conducta inducida por anfetamina en el ratón (Grebb,1986). El tratamiento agudo con nimodipina o flunaricina produce una disminución o un incremento, respectivamente, en los niveles estriatales de DOPAC en la rata y, además, reduce el acúmulo de DOPAC inducido por el haloperidol (Fadda y cols.,1989). La administración crónica de verapamil o diltiazem impide la supersensibilidad inducida por el haloperidol a la apomorfina en ratas (Grebb y cols.,1987). El tratamiento crónico con flunaricina o nimodipina en las ratas induce un incremento significativo en el número de lugares de unión del spiroperidol desplazables por el sulpiride concomitante con un aumento en la constante de disociación (Govoni y cols.,1988a).

1.1. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

A pesar de varias inconsistencias, los datos revisados sugieren que los antagonistas de canales de calcio reducen la transmisión dopaminérgica. Sin embargo ya que estos fármacos son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras moleculares diversas, la cuestión planteada es si los diversos efectos descritos son consecuencia de la inhibición del flujo transmembrana de calcio a través del canal de calcio o si algunos de ellos interfieren con la transmisión dopaminérgica por un mecanismo independiente del de interacción con el transporte de calcio.

Para intentar contestar a esta pregunta, se ha estudiado el

posible efecto de la administración oral aguda y crónica de antagonistas de canales de calcio en el funcionalismo dopaminérgico en el cerebro de rata. Por ello, los objetivos de este trabajo han sido:

1º. Buscar el efecto global de los antagonistas de canales de calcio sobre la función dopaminérgica a través de estudios en tejido estriatal y límbico ya que los niveles tisulares de dopamina y sus metabolitos constituyen la suma de lo que sucede a nivel intra y extracelular.

2º. Estudiar la actividad del enzima tirosina hidroxilasa, limitante en la síntesis de catecolaminas, para conocer su posible afectación por antagonistas de los canales de calcio.

3º. Poner a punto la técnica de microdiálisis cerebral en estriado de ratas despiertas y en libre movimiento.

4º. Buscar el efecto parcial de antagonistas de canales de calcio sobre la función dopaminérgica a través de estudios en líquido extracelular del estriado de rata.

5º. Observar el resultado producido por la despolarización con potasio tras el tratamiento crónico con los fármacos elegidos para observar si el bloqueo mantenido del canal de calcio de tipo L, voltaje dependiente, influencia los procesos típicos de la terminal nerviosa dopaminérgica.

6º. Estudiar el efecto producido por una administración de haloperidol tras el tratamiento crónico con los fármacos elegidos para observar el posible desarrollo de una disminución de la actividad de las neuronas dopaminérgicas, causada por dicho tratamiento.

7º. Comparar los efectos producidos por los fármacos elegidos con los debidos al haloperidol, cuyo mecanismo de acción sobre el

sistema dopaminérgico es conocido, con el fin de establecer la existencia o no de un comportamiento similar.

Debido a la heterogeneidad química de estos compuestos se han probado drogas pertenecientes a tres subclases de antagonistas del calcio: dihidropiridinas (nifedipina y nicardipina), fenilalquilaminas (verapamil) y difenilalquilaminas (flunaricina y cinnarizina). (Fig. 1).

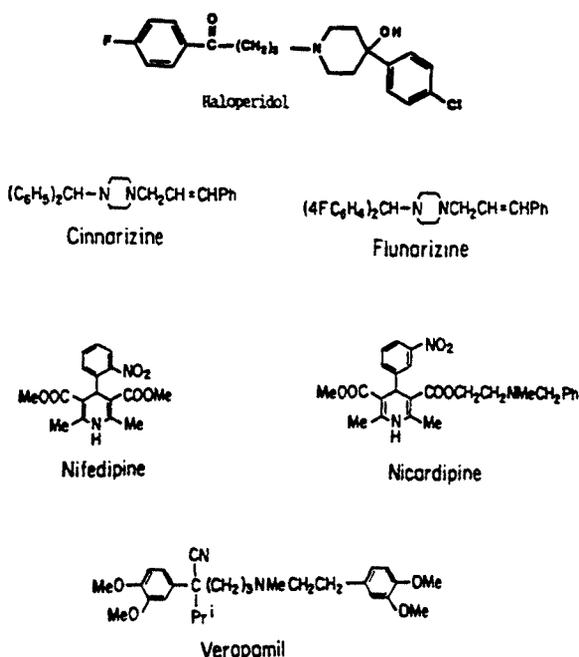


Fig. 1. Fórmulas químicas de los fármacos utilizados en este estudio.

1.2. DOPAMINA.

(Schwartz,1985a; Cooper y cols.,1986; Illes,1986; Nicoll y cols.,1990)

Las aminas biógenas o monoaminas incluyen las catecolaminas, dopamina, noradrenalina y adrenalina, y la indolamina, serotonina.

El término catecolamina se refiere genéricamente a todos los

compuestos orgánicos que contienen un núcleo catecol (un anillo de benzeno con dos sustituyentes hidroxilo adyacentes) y un grupo amino. En la práctica el término catecolamina implica usualmente a la dihidroxifeniletilamina (dopamina, DA), la noradrenalina (NA) o norepinefrina (NE) y la adrenalina (A) o epinefrina (E).

La serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT) por su parte, pertenece a un grupo de compuestos aromáticos llamados indoles que poseen un anillo de benzeno unido a un anillo de cinco lados conteniendo nitrógeno.

1.2.1. Biosíntesis. Regulación. (Fig. 2).

La dopamina se forma del aminoácido precursor tirosina por medio de una secuencia de pasos enzimáticos postulada primero por Blaschko en 1939 y continuada por Nagatsu y cols en 1964.

Este aminoácido está presente normalmente en la circulación sanguínea. Es concentrado dentro del cerebro por un mecanismo de transporte activo. Una vez dentro de la neurona, la tirosina sufre una serie de transformaciones químicas resultando al final en la formación de dopamina o norepinefrina o epinefrina dependiendo de la disponibilidad de la feniletanolamina-N-metil transferasa o de la dopamina- β -hidroxilasa.

En los mamíferos, la tirosina puede derivar de la fenilalanina de la dieta por la acción de una hidroxilasa (fenilalanina hidroxilasa) que se encuentra principalmente en el hígado. Tanto la fenilalanina como la tirosina son constituyentes normales del cerebro de mamíferos.

simpácticamente. Parece ser un constituyente único de las neuronas catecolaminérgicas y células cromafines. Desaparece tras la denervación simpática crónica. Es un enzima estereoespecífico, requiere oxígeno molecular, hierro y como cofactor la tetrahidropteridina y muestra un grado bastante elevado de especificidad de sustrato. Este enzima oxida solo el aminoácido L-tirosina y en menor extensión la L-fenilalanina. La fenilalanina hidroxilasa y la tirosina hidroxilasa parecen ser enzimas diferentes ya que la fenilalanina hidroxilasa no hidroxila la tirosina y no es inhibida por algunos potentes inhibidores de la tirosina hidroxilasa.

La K_m para la conversión enzimática de tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es 0.4×10^{-5} M en una preparación de sinaptosomas cerebrales. La hidroxilación de la tirosina es el paso limitante en la biosíntesis de la dopamina. La actividad de la DOPA descarboxilasa y la de la dopamina β oxidasa tiene una magnitud 100-1000 veces superior a la de la tirosina hidroxilasa. La menor actividad de ésta puede deberse o a la presencia de menor enzima o a un menor recambio del mismo.

Aunque no directamente involucrada en la biosíntesis de catecolaminas, la dihidropteridina reductasa (DHR) está íntimamente unida a la acción de la tirosina hidroxilasa. Este enzima cataliza la reducción del quinonoide tetrahidrobiopterina que ha sido oxidado durante la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA. Ya que las pteridinas reducidas son esenciales para la hidroxilación de la tirosina, las alteraciones en la actividad de la DHR influenciarían efectivamente la actividad de la tirosina hidroxilasa. Por otro lado el recambio de la tetrahidrobiopterina es lo suficientemente rápido como para que

las alteraciones en su síntesis o degradación puedan modificar la velocidad de la síntesis de monoaminas (Kapatos,1990).

La distribución de la DHR es bastante difusa pero su mayor actividad se encuentra en el hígado, cerebro y glándula adrenal. La distribución de la actividad de este enzima en el cerebro no parece ser paralela con el contenido en catecolaminas o serotonina del tejido cerebral sugiriendo que las pteridinas reducidas participan en otras reacciones además de la hidroxilación de la tirosina y el triptófano.

El segundo enzima involucrado en la biosíntesis de dopamina es la L-aminoácido-decarboxilasa que fue el primer enzima de esta vía que se descubrió. Aunque inicialmente se pensó que eliminaba grupos carboxilo solo de la L-DOPA, un estudio de preparaciones enzimáticas purificadas e inhibidores específicos demostró que esta decarboxilasa actúa sobre todos los L-aminoácidos aromáticos que existen naturalmente. De ahí que sea más apropiado denominarlo L-aminoácido aromático-decarboxilasa que DOPA-decarboxilasa como se llamó en un principio. No hay unión apreciable de este enzima a partículas dentro de la célula ya que cuando los tejidos son desorganizados y los homogenados resultantes centrifugados a altas velocidades, la actividad decarboxilasa permanece asociada ampliamente con la fracción sobrenadante.

La excepción se encuentra en el cerebro donde alguna actividad decarboxilasa está asociada con sinaptosomas. Sin embargo, ya que éstos son terminaciones nerviosas pueden contener citoplasma así como organelas intracelulares. La L-aminoácido-decarboxilasa encontrada en preparaciones sinaptosomales estaría presente en el citoplasma atrapado.

Este enzima es, con relación a otros enzimas en la vía sintética de la DA, muy activo y requiere piridoxal fosfato (vitamina B6) como cofactor. Su elevada actividad puede explicar por qué ha sido difícil detectar L-DOPA endógena en cerebro y en tejido inervado simpáticamente. Es bastante ubicuo en la naturaleza existiendo en el citoplasma de la mayoría de los tejidos incluyendo el hígado, el estómago, el cerebro, y los riñones en elevada cantidad sugiriendo que su función en el metabolismo no se limita únicamente a la síntesis de DA. Aunque la actividad de la decarboxilasa puede disminuir por un déficit de vitamina B6 en animales esto no suele ocasionar una reducción significativa de catecolaminas tisulares aunque parece interferir con la velocidad de repleción de las mismas.

Regulación de la síntesis de dopamina.

La transmisión sináptica depende de la disponibilidad sostenida de las moléculas de un transmisor. Una neurona puede regular su nivel de sustancia transmisora por mecanismos a corto y a largo plazo.

A corto plazo, para la adaptación inmediata a la utilización del transmisor mediante alteraciones transitorias en la actividad de proteínas enzimáticas y de membrana.

Hace más de 20 años von Euler hipotetizó a partir de experimentos llevados a cabo en la médula adrenal que durante períodos de actividad funcional incrementada, la neurona simpática debía aumentar la síntesis de su transmisor para responder a las demandas, lo que le permitiría mantener un nivel constante del mismo a pesar de cambios sustanciales en la

utilización del transmisor. Algunos años después ésto se demostró y se vió que era debido a un incremento de la actividad del enzima limitante: tirosina hidroxilasa. Durante períodos de incremento de flujo de impulsos, cuando más transmisor es liberado y metabolizado, un depósito regulador del mismo, accesible a la TH, es depleccionado, desapareciendo la inhibición por el producto final con lo que la actividad de la TH es incrementada. Por lo mismo, durante períodos en que la utilización del transmisor disminuye, éste se acumula y la actividad de la TH disminuye. En la última década se ha acumulado evidencia de que la desaparición de la inhibición por producto terminal de la TH es un mecanismo operativo en la neurona simpática y en las neuronas catecolaminérgicas centrales para aumentar la síntesis del neurotransmisor en respuesta a incrementos del flujo de impulsos (Fujisawa y Okuno,1989).

En años más recientes se ha visto que la regulación de la TH es un proceso mucho más complejo y que además de la regulación por el producto final, otros procesos íntimamente ligados a la actividad neuronal controlan la síntesis de catecolaminas. La fosforilación es un proceso por el que las neuronas catecolaminérgicas pueden regular la actividad de la TH en respuesta a la actividad neuronal. Se ha llevado a cabo mucho trabajo para dilucidar el sistema de segundo mensajero involucrado en la activación de la tirosina hidroxilasa (Santiago y Westerink,1990). Hay evidencia de que hay un sistema de fosforilación dependiente del AMP cíclico (Goldstein,1984) y otro independiente de éste y dependiente de calcio/calmodulina (El Mestikawy y cols.,1983; Sutoo y cols.,1989; Fujisawa y Okuno,1990). La fosforilación dependiente de calcio/calmodulina

se produce en caso de despolarización neuronal y es aditiva a la dependiente de AMP cíclico (El Mestikawy y cols.,1983) (ver pag. 47).

No queda claro cuáles receptores intervienen en desencadenar la fosforilación, aunque parece que serían los autorreceptores dopaminérgicos (Goldstein,1984; Laschinski y cols.,1984; Santiago y Westerink,1990).

Fujisawa y Okuno (1990) concluyen que la inactivación del enzima por las catecolaminas, productos finales del enzima, y la activación por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico podrían ser los factores más importantes en controlar la actividad del enzima.

Por otro lado, la síntesis de nuevas macromoléculas está implicada en aquellos cambios que persisten por largos períodos de tiempo. Así las alteraciones a largo plazo en la producción de transmisores dependen de cambios en la expresión del gen. Además de los mecanismos comentados anteriormente para la adaptación inmediata a la mayor utilización del transmisor, un segundo mecanismo a largo plazo entra en funcionamiento tras incrementos prolongados en la actividad de las neuronas catecolaminérgicas. En años recientes se ha acumulado evidencia de que hay un incremento en la formación de nuevas moléculas del enzima de modo que la actividad neuronal prolongada resulta en una inducción de la TH.

Este proceso de inducción no parece ser específico para la TH ya que se observa también un incremento en la formación de dopamina β hidroxilasa. No se ha reportado incremento en la formación de la L-aminoácido-decarboxilasa. Joh y cols. (1983) han propuesto que los enzimas principales involucrados en la

síntesis de catecolaminas, TH, dopamina β hidroxilasa y feniletanolamina-N-metil-transferasa pueden derivar de un gen común y así pueden ser corregulados, es decir coinducidos, en diversas circunstancias. En las neuronas noradrenérgicas, donde el gen de la transferasa no se expresa, la estimulación resulta solo en el incremento de la síntesis de las dos hidroxilasas. En la médula adrenal y en las neuronas que sintetizan adrenalina, la síntesis de los tres enzimas esta incrementada.

1.2.2. Recambio.

Este término se refiere al ritmo global con que el depósito total de aminos dentro de un tejido dado es reemplazado. Su estimación se suele utilizar como un indicador del estado funcional de las neuronas catecolaminérgicas, aunque resulta equívoco ya que no es un índice de la capacidad sintetizadora de las neuronas ni de la liberación de neurotransmisores ni de su metabolismo y puede inducir a error.

1.2.3. Almacenamiento.

Un gran avance conceptual hecho en el estudio de las catecolaminas hace más de 20 años fue el reconocimiento de que en casi todos los tejidos un gran porcentaje de las aminos está localizado dentro de partículas subcelulares especializadas. Estos gránulos o vesículas contienen adenosina trifosfato (ATP) en una proporción molar de catecolamina/ATP de aproximadamente 4/1.

Schwartz (1985) propone que los grupos de fosfato aniónico del

ATP forman un enlace con la amina, que existe como catión a pH fisiológico, y por tanto sirven como medio de unión de las aminas dentro de las vesículas. Estos complejos de las aminas con ATP, con ATP asociado con proteínas, o con proteínas directamente, son probables ya que la concentración intravesicular de aminas sería hipertónica si estuviese en concentración libre y conduciría a la lisis osmótica de las vesículas. Debido a que la presión osmótica depende del número de moléculas polares en una solución y no de su tamaño, la formación de complejos dentro de la vesícula serviría para disminuir la actividad osmótica resultante de la alta concentración intravesicular de trasmisor.

Se cree que las vesículas se forman en el cuerpo celular y luego son transportadas a la terminal nerviosa, pero también son capaces de reciclarse como demuestran Bonzelius y Zimmermann (1990).

1.2.4. Liberación. Regulación.

Se sabe muy poco del mecanismo por el que los impulsos nerviosos axonales que llegan a la terminal causan la liberación de DA (acoplamiento excitación-secreción). El esquema corrientemente aceptado de secreción evocada de trasmisor puede ser resumido (Smith y Augustine, 1988) así: 1º) una onda de despolarización, el potencial de acción, invade la terminal nerviosa y abre canales de Ca^{++} sensibles al voltaje; 2º) el Ca^{++} extracelular, preequilibrado con la superficie extracelular de la membrana de la terminal nerviosa, entra en la terminal a través de estos canales, a favor de gradiente de concentración; 3º) el Ca^{++} , una vez cerca de la cara interna de la membrana de

la terminal, difunde desde la boca del canal a un receptor de Ca^{++} ; 4º) la unión del Ca^{++} a ese receptor provoca que las vesículas sinápticas se fundan con la membrana en lugares de liberación específicos con lo que el contenido en transmisores de las vesículas es liberado a la hendidura sináptica por exocitosis.

Parece bastante improbable que la liberación del transmisor ocurra exclusivamente por un proceso de exocitosis, ya que ésta requiere que todo el contenido de la vesícula sea liberado (catecolaminas, ATP y proteínas solubles). Como la región terminal parece incapaz de llevar a cabo cualquier tipo de síntesis proteica, serían requeridas velocidades elevadas de flujo axonal desde el cuerpo de la neurona para recuperar la proteína perdida durante el proceso de exocitosis.

De hecho, se han caracterizado dos tipos de liberación de dopamina (Westerink y cols.,1987a; Westerink y cols.,1989; Fairbrother y cols.,1990), uno dependiente del potencial y del calcio, que representa la exocitosis clásica, y otro independiente del potencial y del calcio que es el mediado por transportador (Liang y Rutledge,1982). Este último, al contrario del anterior, es bloqueado por inhibidores de la recaptación. Westerink describe, además, un tercer mecanismo, independiente del potencial y dependiente del calcio que es el provocado por la despolarización con potasio.

Hay evidencia de que la DA recién sintetizada puede liberarse preferentemente (Zetterström y cols.,1988; Fairbrother y cols.,1990), lo que apoyaría la propuesta de la existencia de más de un depósito de DA (¿citosólico y vesicular?).

Regulación de la liberación de dopamina.

Se estima que dentro del sistema nervioso central una neurona puede recibir alrededor de 10000 contactos sinápticos. Los receptores de los neurotransmisores, de los que se describen cada vez mayor cantidad de subtipos, están localizados pre y postsinápticamente, hay múltiples neurotransmisores colocados y los neurotransmisores liberados en las hendiduras sinápticas llegan a sus receptores junto con otros mensajeros que han llegado como factores hormonales o paracrinos (Brinton,1990).

Las neuronas dopaminérgicas no son una excepción a esta complejidad. La liberación de DA depende tanto de la frecuencia de encendido de las células dopaminérgicas como de procesos reguladores presinápticos. Varios transmisores contenidos en fibras aferentes, neuronas intrínsecas o colaterales de neuronas eferentes del estriado parecen controlar presinápticamente la liberación de DA por medio de receptores heterólogos. No solo la concentración sináptica local de dopamina modula su propia liberación, sino también otras aminas (acetilcolina, serotonina, noradrenalina), aminoácidos (GABA, glutamato, glicina) y neuropéptidos (colecistoquinina, somatostatina, sustancia P etc.) modulan la liberación espontánea o evocada por despolarización de DA en cortes estriatales de rata (Chéramy y cols.,1990).

Por otro lado, la dopamina actuando a través de receptores D₁ fosforila proteínas asociadas a vesículas sinápticas y estimula la liberación de GABA en el estriado dorsal y en la sustancia nigra reticulata y actuando mediante receptores D₂ (por un mecanismo desconocido) es capaz de inhibir la liberación de varios neurotransmisores como glutamato, acetilcolina o GABA.

Parece que los receptores D₂ pueden ejercer una inhibición tónica en la síntesis, mediada por los receptores D₁, de AMP cíclico y causar una disminución en la fosforilación de proteínas vesiculares (Walaas y cols.,1989).

La evidencia más convincente, sin embargo, es el papel de los autorreceptores en la modulación de la liberación de dopamina inducida por impulsos nerviosos. Se ha establecido el concepto de que los autorreceptores modulan la liberación al responder a concentraciones de dopamina en la sinapsis, altas concentraciones inhibiendo la liberación y bajas concentraciones aumentándola. La administración de agonistas dopaminérgicos atenúa la liberación inducida por estímulo mientras que los antagonistas la aumentan (Zetterström y Ungerstedt,1984; Imperato y Di Chiara,1984; 1985; Zeterström y cols.,1985).

Por otro lado, el modo en que una neurona dispone del transmisor para terminar la señal es crítico, porque si un transmisor liberado persiste durante un tiempo prolongado en la sinapsis bloquea la aparición de una nueva señal (Schwartz,1985). Hay tres mecanismos por los que se finaliza la acción de un transmisor: difusión, degradación enzimática y recaptación (Krueger,1990).

La difusión elimina alguna fracción de todos los mensajeros químicos y puede ser un medio importante para librar a la hendidura sináptica del transmisor. La degradación enzimática se utiliza principalmente para el sistema colinérgico con el fin de recuperar la colina. Por último, la recaptación del transmisor desde la sinapsis es el mecanismo más común para la inactivación en el caso de las aminas biógenas.

1.2.5. Metabolismo.

Los enzimas de importancia en la degradación metabólica de las catecolaminas son la monoaminoxidasa (MAO) y la catechol-O-metil-transferasa (COMT). (Fig. 2).

La monoaminoxidasa convierte a las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos. Estos son rápidamente metabolizados, usualmente por oxidación por el enzima aldehído dehidrogenasa, al ácido correspondiente. En algunos casos el aldehído es reducido a alcohol o glicol por la aldehído reductasa.

La monoaminoxidasa es una proteína de la membrana externa de la mitocondria aunque no se excluye una situación microsomal. Está localizada tanto en neuronas como en células gliales (Hansson y Sellström, 1983). Se suele considerar un enzima intraneuronal, pero ocurre en abundancia extraneuronalmente. De hecho, la mayoría de experimentos indican que la denervación crónica de una terminal simpática conduce solo a una pequeña reducción en la MAO, sugiriendo que la mayor proporción de este enzima es, de hecho, extraneuronal. Sin embargo, el enzima intraneuronal es el importante en el metabolismo de catecolaminas. La localización intraneuronal de la MAO sugiere que su acción se limita a aminas que están presentes en forma libre en el axoplasma.

La MAO en cerebro de diversas especies existe en al menos dos formas diferentes, tipo A y tipo B, basadas en la especificidad de substrato y en la sensibilidad a la inhibición por inhibidores seleccionados. En el cerebro de rata predomina la MAO A (Kato y cols., 1986) y en el humano la MAO B y además el predominio de la actividad de la MAO B se encuentra en el caudado, hipotálamo y

sustancia negra (Riederer y Youdim,1986). La clorgilina es un inhibidor específico del tipo A que tiene una preferencia de substrato por NA y serotonina. El deprenil es inhibidor selectivo del tipo B que tiene preferencia de substrato por la β -fenil-etil-amina y la benzilamina. La dopamina, tiramina y triptamina parecen ser buenos substratos para ambas formas de enzima.

Tanto en ratas como en humanos la MAO A está presente principalmente en sinaptosomas dopaminérgicos, mientras que en el tejido cerebral extramonoaminérgico están presentes ambos tipos de enzimas. Stenström y cols. (1987) realizaron un estudio interespecies del predominio y actividad de ambos tipos de MAO. Llegan a la conclusión de que incluso en especies donde predomina la MAO B (cerdo, gato y hombre) la deaminación sinaptosomal de la DA es llevada a cabo principalmente por la MAO A. Al hacer un análisis de la distribución de la actividad de la MAO intra y extrasinaptosomal observaron que en el gato, el cerdo y la rata la mayoría de DA es oxidada dentro de los sinaptosomas dopaminérgicos mientras que en el hombre sucede lo contrario.

La catechol-O-metil-transferasa es un enzima relativamente inespecífico que cataliza la transferencia de grupos metilo desde la S-adenosil metionina al grupo hidroxilo de las catecolaminas y otros compuestos catecoles y requiere Mg^{++} . Existe en el citoplasma de la mayoría de tejidos animales siendo particularmente abundante en riñón e hígado. Una cantidad sustancial de este enzima se encuentra en el SNC y en varios órganos inervados simpáticamente.

La localización celular precisa de la COMT no ha sido determinada aunque parece que existe en una forma citoplasmática de predominio glial (Hansson y Sellström,1983) y una forma unida

a membranas que estaría asociada a las neuronas (Rivett y cols.,1983; Kaakkola y cols.,1987) y células gliales (Kaakkola y cols.,1987) y sería la encargada del metabolismo de las catecolaminas tras su liberación a la hendidura sináptica (Rivett y cols.,1983). Ambas formas residen postsinápticamente a las neuronas dopaminérgicas (Kaakkola y cols.,1987).

1.2.6. Recaptación.

Las acciones sinápticas de las catecolaminas y aminos biógenas relacionadas terminan principalmente por el mecanismo de recaptación. La recaptación de un transmisor ocurre contra un gradiente de concentración requiriendo por tanto, gasto de energía metabólica.

Krueger (1990) observa dos componentes diferentes de captación de dopamina. Uno, el principal, tiene las propiedades esperadas para un sistema de transporte activo que utiliza un transportador. Es saturable con respecto a la concentración de DA y requiere Na^+ y Cl^- externos para funcionar. Resulta antagonizado por los fármacos inhibidores de la recaptación de un modo competitivo.

El segundo componente se ocupa de un 10-30% de la captación de DA, no es saturable, y es independiente del Na^+ y Cl^- extracelulares y de los bloqueantes de la recaptación.

El transportador de DA está asociado al gradiente electroquímico del Na^+ . En caso de despolarización disminuye la recaptación de DA debido al acúmulo de Na^+ en el interior de la célula pudiendo llegar a invertirse el mecanismo (Liang y Rutledge,1982). Woodward y cols. (1988) estudiando la liberación

de DA endógena de sinaptosomas estriatales de rata y su dependencia del calcio llegan a la conclusión de que hay una fase rápida de liberación que es dependiente de calcio y una fase lenta que es independiente de calcio y puede ser mediada por inversión del sistema de transporte de DA ligado al Na⁺. (ver pag. 14)

1.3. SISTEMAS DOPAMINERGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

(Nieuwenhuys,1985; Cooper y cols.,1986; García de Yébenes y Mena Gómez,1988; Graybiel,1990).

La distribución de neuronas conteniendo monoaminas en el SNC ha sido estudiada en varios mamíferos utilizando técnicas histoquímicas de fluorescencia. La principal limitación de estas técnicas es que no distinguen entre las diversas catecolaminas (todas fluorescen en verde) y presentan poca sensibilidad hacia la serotonina.

Más recientemente, se han conseguido anticuerpos contra los enzimas involucrados en la síntesis de catecolaminas y hay, además, anticuerpos contra la serotonina y la dopamina. Los datos obtenidos usando la clásica histofluorescencia de las monoaminas está siendo reexaminada con las nuevas técnicas inmunohistoquímicas y se tiene mayor información concerniente a la organización de las neuronas monoaminérgicas y sus proyecciones al combinar estas técnicas con lesiones o con métodos de marcaje retrógrado.

Los grupos neuronales que sintetizan monoaminas están situados principalmente en el tronco del encéfalo y distribuyen sus productos por finas proyecciones, profusamente ramificadas, a

gran parte del encéfalo y la médula espinal.

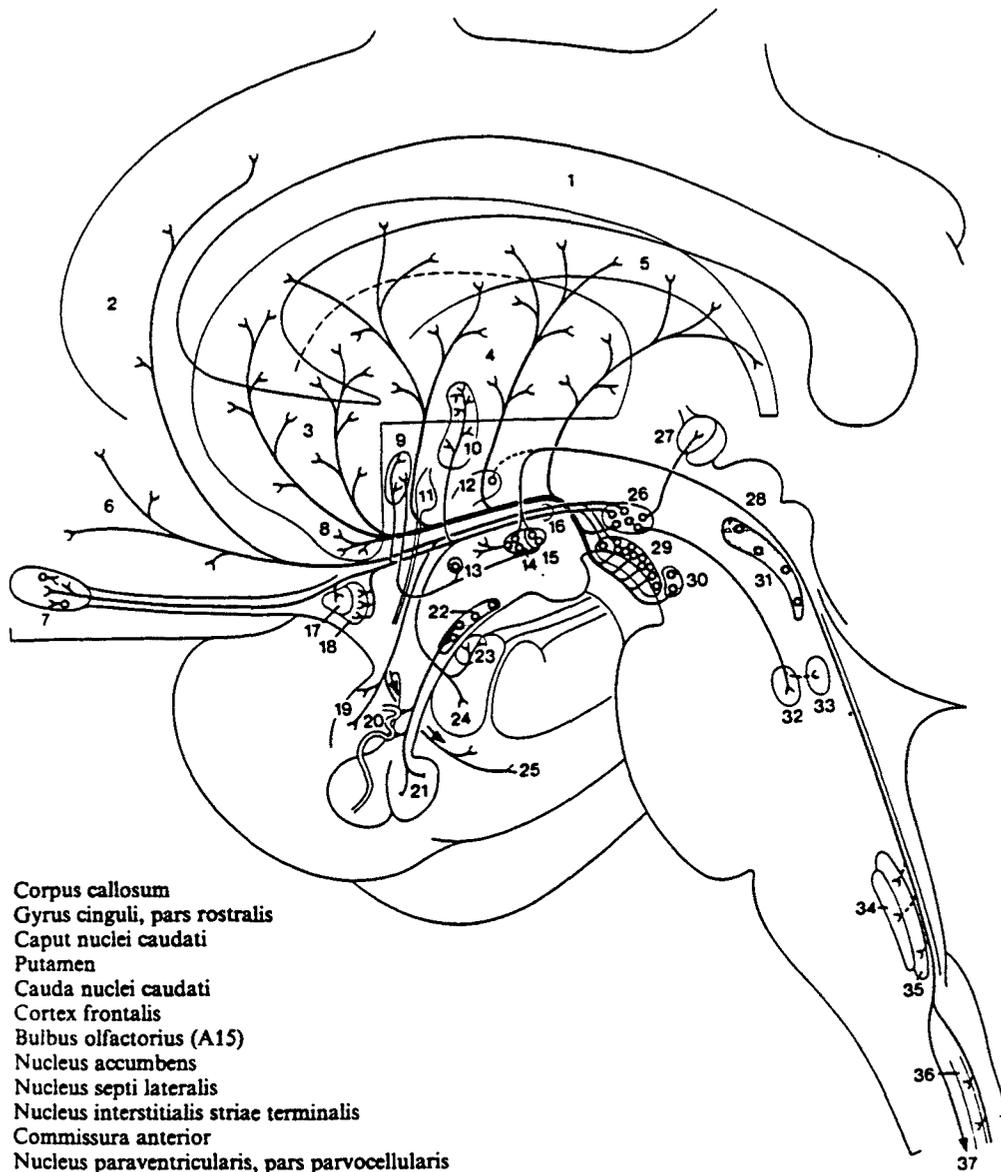
Las células noradrenérgicas han sido designadas colectivamente como A1-A7 y las dopaminérgicas como A8-A15. Los grupos serotoninérgicos como B1-B9, y las células adrenérgicas como C1-C2.

Estudios en una variedad de especies, incluyendo primates y hombre, han mostrado una constancia remarcable en la organización de los grupos celulares monoaminérgicos entre los mamíferos. La distribución de neuronas pigmentadas con neuromelanina en el encéfalo humano parece corresponderse íntimamente con la de los grupos celulares catecolaminérgicos.

Las neuronas que sintetizan DA se encuentran en el mesencéfalo y en el prosencéfalo (diencéfalo y telencéfalo). (Fig. 3)

Las células dopaminérgicas mesencefálicas forman tres grupos A8, A9 y A10 cuyos límites son indistintos. Las células del grupo A8 están situadas en el tegmento lateral, justo caudal al nivel del núcleo rojo. Este grupo se mezcla ventromedialmente con el A9 que es la zona compacta de la sustancia negra. El grupo A10 es un agregado impar en la línea media que está situado medial a la sustancia negra y ventral al núcleo rojo. Queda limitado ventralmente por el núcleo interpeduncular. La mayoría de las células del grupo A10 están localizadas dentro de los límites del área tegmental ventral.

En el diencéfalo se distinguen cuatro grupos celulares dopaminérgicos: A11, A12, A13 y A14. El grupo A13 consiste principalmente en pequeños grupos de células situadas en la parte caudalmedial de la zona incerta. El grupo A11 es su continuación caudal y sus células están localizadas en el hipotálamo caudal, dispersas alrededor del tracto mamilotalámico. El grupo A12 está



- | | | | |
|----|---|----|--------------------------------------|
| 1 | Corpus callosum | 27 | Nucleus habenulae lateralis |
| 2 | Gyrus cinguli, pars rostralis | 28 | Fasciculus longitudinalis dorsalis |
| 3 | Caput nuclei caudati | 29 | Substantia nigra, pars compacta (A9) |
| 4 | Putamen | 30 | Area tegmentalis lateralis (A8) |
| 5 | Cauda nuclei caudati | 31 | Nucleus raphes dorsalis |
| 6 | Cortex frontalis | 32 | Locus coeruleus |
| 7 | Bulbus olfactorius (A15) | 33 | Nucleus parabrachialis lateralis |
| 8 | Nucleus accumbens | 34 | Nucleus dorsalis nervi vagi |
| 9 | Nucleus septi lateralis | 35 | Nucleus solitarius |
| 10 | Nucleus interstitialis striae terminalis | 36 | Substantia gelatinosa |
| 11 | Commissura anterior | 37 | Nucleus intermediolateralis |
| 12 | Nucleus paraventricularis, pars parvocellularis | | |
| 13 | Cell group A14 | | |
| 14 | Cell group A13 | | |
| 15 | Cell group A11 | | |
| 16 | Fasciculus telencephalicus medialis | | |
| 17 | Nucleus olfactorius anterior | | |
| 18 | Substantia perforata anterior | | |
| 19 | Cortex praepiriformis | | |
| 20 | Eminentia mediana | | |
| 21 | Lobus posterior hypophyseos | | |
| 22 | Nucleus infundibularis (A12) | | |
| 23 | Nucleus centralis amygdalae | | |
| 24 | Nucleus basalis amygdalae | | |
| 25 | Cortex entorhinalis | | |
| 26 | Area tegmentalis ventralis (A10) | | |

Fig. 3. Células y fibras dopaminérgicas (Nieuwenhuys, 1985).

situado dentro de los confines del núcleo infundibular. El grupo A14 que es pequeño y poco notorio en los primates se encuentra en la zona periventricular del hipotálamo rostral.

En el telencéfalo el bulbo olfatorio es el único centro conteniendo neuronas dopaminérgicas. Están dispersas por la zona externa del bulbo y forman parte de un grupo de interneuronas, las células peri o yuxtaglomerulares. Colectivamente se han designado como A15.

Además parece que el núcleo del rafe dorsal y sus alrededores contienen también células dopaminérgicas.

1.3.1. Sistemas dopaminérgicos mesoestriatal, mesolímbico y mesocortical.

La población mesencefálica de células dopaminérgicas da lugar a una proyección ascendente masiva que Ungerstedt (1971) dividió en dos sistemas: sistema dopaminérgico nigrostriatal que se origina principalmente del grupo A9 y sistema dopaminérgico mesolímbico que surge principalmente del grupo A10.

En literatura más reciente se ha enfatizado que las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo constituyen un único grupo proyectándose en orden topográfico a regiones estriatales, límbicas y corticales telencefálicas, recibiendo el nombre de sistema dopaminérgico mesotelencefálico. Está organizado en tres planos: medial-lateral, rostral-caudal y dorsal-ventral.

La topografía medial-lateral está organizada de tal manera que los sectores mediales de la sustancia negra-área tegmental ventral se proyectan a áreas terminales localizadas más medialmente, mientras que los sectores laterales de la sustancia

negra-área tegmental ventral se proyectan a áreas localizadas más lateralmente en el telencéfalo.

Células dopaminérgicas mesencefálicas localizadas rostralmente parecen proyectarse más rostralmente y células caudales a áreas más caudales del telencéfalo.

La topografía dorsal-ventral parece estar invertida. Las células mesencefálicas ventrales tienden a proyectarse a estructuras más dorsales como el septum, el núcleo accumbens y el neostriado mientras que las células mesencefálicas dorsales tienden a proyectarse a estructuras más ventrales como el tubérculo olfatorio y el complejo amigdaloides.

Por razones prácticas el sistema mesotelencefálico es subdividido en tres subsistemas: mesoestriatal, mesolímbico y mesocortical. (Fig. 3)

La proyección mesoestriatal se origina de los grupos celulares A8, A9 Y A10. Sus fibras se juntan en el tegmento medial y entran en el diencéfalo, en la parte dorsal del área hipotalámica lateral. Corriendo rostralmente a través de ésta última área, la mayoría de sus fibras divergen dorsal y lateralmente y después de haber atravesado la cápsula interna se desvanecen en el caudado y el putámen donde forman una red terminal extremadamente densa.

La inervación dopaminérgica del núcleo caudado y del putámen se origina ampliamente de la parte compacta de la sustancia nigra, pero los grupos A8 y A10 también participan en esta inervación. Las células del grupo A8 que pueden considerarse una extensión caudolateral de la sustancia nigra se proyectan al putámen ventral. La parte procedente de la sustancia nigra compacta se proyecta predominantemente a los estriosomas y la

del grupo A8 a la matriz estriatal. A su vez la matriz se proyecta principalmente al pálido y a la sustancia negra reticulata y los estriosomas a la sustancia negra compacta y/o sus alrededores más inmediatos. Con respecto a la contribución del grupo A10 a la inervación del neostriado, no hay unanimidad. Algunos investigadores afirman que esta proyección está confinada a la porción más rostromedial del complejo caudado-putámen pero otros presentan evidencia de que las eferentes provenientes del área tegmental ventral están distribuidas más ampliamente, extendiéndose sobre toda la mitad ventromedial del neostriado.

Colaterales de la proyección mesoestriatal constituyen un plexo bastante escaso de axones terminales conteniendo dopamina a través del globus pallidus.

La proyección mesolímbica surge del grupo celular A10 y de la parte más medial de la sustancia nigra. Sus fibras ascienden medialmente a la proyección mesoestriatal en el haz prosencefálico medial y están distribuidas a las siguientes estructuras telencefálicas: núcleo accumbens, bulbo olfatorio (terminales dispersos en todas las capas), núcleo olfatorio anterior (inervación escasa o moderada), tubérculo olfatorio o sustancia perforada anterior (muy denso), núcleo septal lateral, núcleo de la estria terminal (plexo denso, particularmente en su parte dorsal) y complejo amigdalóide (concentrado en los núcleos central y basal y grupos celulares intercalados).

No puede hacerse una clara distinción entre las proyecciones mesolímbica y mesocortical. Primeramente porque ambas proyecciones se originan del grupo A10 y de la porción medial de la sustancia nigra, y en segundo lugar porque la mayoría de las áreas corticales de terminación de ésta última proyección pueden

considerarse parte del sistema límbico. Estas áreas incluyen: parte medial del lóbulo frontal, córtex prepiriforme y piriforme, córtex entorrinal y córtex cingulado anterior. En la mayoría de éstas áreas las fibras dopaminérgicas constituyen campos de terminación densos y bien delineados.

No todas las fibras que ascienden desde la parte compacta de la sustancia nigra y área tegmental ventral al telencéfalo, son dopaminérgicas. Así, las proyecciones al caudado, putámen y núcleo accumbens contienen una pequeña proporción de fibras no dopaminérgicas. Un mayor porcentaje de fibras no dopaminérgicas se ha encontrado en la proyección al núcleo septal lateral, mientras en la proyección al córtex frontal medial solo alrededor de 1/3 de las fibras parecen ser dopaminérgicas.

Aparte de la gran proyección mesotelencefálica, la población de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas da lugar a algunas proyecciones eferentes adicionales. Así, hay evidencia de que el grupo A10 se proyecta por medio del fascículo retroflexo, al núcleo habenuar lateral, que el núcleo subtalámico contiene un plexo de fibras catecolaminérgicas que posiblemente esté constituido por colaterales del haz nigrostriatal y que el área tegmental ventral se proyecta bilateralmente al locus coeruleus.

1.3.2. Sistemas dopaminérgicos diencefálicos.

Los grupos celulares dopaminérgicos diencefálicos A11, A12, A13, A14 dan lugar a cuatro sistemas eferentes: túbero-infundibular y túbero-hipofisario, incerto-hipotalámico, hipotálamo-septal e hipotálamo-espinal. (Fig. 3)

La proyección túbero-infundibular y túbero-hipofisaria surge

principalmente de las células del grupo A12. Los axones de estas células pasan a la parte rostroventral del infundibulum y terminan en todas las capas de la eminencia media, pero son más abundantes en la capa externa. Muchos axones continúan más allá de la eminencia media y atraviesan el tallo de la hipófisis para alcanzar el lóbulo intermedio donde forman un plexo denso. Hay evidencia sugiriendo que la DA liberada de las fibras túbero-infundibulares es transportada a la hipófisis anterior por el sistema porta hipotálamo-hipofisario para inhibir la liberación de las células secretoras de prolactina. Sin embargo el control de la liberación de prolactina parece ser complejo y la DA no es el único factor inhibidor de la prolactina. Se desconoce la función de las fibras dopaminérgicas túbero-hipofisarias.

La proyección incerto-hipotalámica surge del complejo formado por los grupos A11 y A13. Consiste en fibras cortas, difusamente ordenadas que se distribuyen dentro de sus áreas de origen y en las regiones hipotalámicas dorsal y rostral adyacentes.

La proyección diencéfalo-septal consiste en fibras que pasan desde los grupos A11, A13 y A14 al núcleo septal lateral. Así este centro septal, que está inervado principalmente con fibras dopaminérgicas que se originan en el mesencéfalo, recibe una proyección dopaminérgica adicional desde el diencéfalo.

La proyección hipotálamo-espinal en la rata se origina en células localizadas en el hipotálamo caudal, pertenecientes al grupo celular A11 y pasa a la mitad ipsilateral de la médula espinal donde sus fibras descienden parcialmente dentro de la lámina I del asta dorsal y parte adyacente del cordón dorsolateral, y parcialmente a lo largo del canal central. Hay fibras que se proyectan a la región del complejo dorsal del vago

y núcleo del tracto solitario. El curso exacto de estas fibras dopaminérgicas descendente a través del tronco del encéfalo no se conoce todavía.

1.4. CALCIO Y FISILOGIA NEURONAL.

1.4.1. GENERALIDADES.

(Rubin,1985; Walaas y Nairn,1985; De Lorenzo,1985; Miller,1988).

El conocimiento de la importancia biológica del calcio empezó hace aproximadamente un siglo con el descubrimiento casual de Sydney Ringer en 1883 de que una solución de NaCl en agua del grifo era más eficaz en mantener la contractilidad cardiaca que la preparada en agua destilada. Ringer concluyó que la mínima cantidad de calcio presente en el agua del grifo antagonizaba los efectos lesivos del sodio. Locke y otros investigadores demostraron más tarde que los nervios motores expuestos a NaCl puro pierden sus efectos estimuladores de la contractilidad muscular y los recuperan de nuevo al añadir calcio y potasio en concentraciones adecuadas.

Así, a principios del s. XX los investigadores ya sabían que la actividad biológica normal depende de concentraciones específicas de calcio, sodio y potasio, con el calcio ocupando una posición clave.

Debido a sus propiedades únicas, el calcio es el catión más esencial en términos de diversidad de función. El 95% del Ca⁺⁺ corporal se encuentra en el hueso en equilibrio dinámico con los depósitos restantes de calcio del organismo. Además de proporcionar rigidez a éste por ser un constituyente principal

del hueso, el Ca^{++} ejerce efectos significativos en las propiedades estructurales y funcionales de las biomembranas.

Es un transportador de carga a través de las membranas biológicas de las células excitables e influencia la excitabilidad de éstas al afectar la cinética de la permeabilidad al sodio y al potasio ya que las vías utilizadas en la excitación de las biomembranas son canales de flujo iónico selectivo.

Los iones calcio juegan un papel principal en la actividad y función del tejido nervioso: síntesis y liberación de neurotransmisores, respiración mitocondrial y glucogenolisis regulada por la actividad neuronal, fenómenos de exocitosis y endocitosis y control de canales iónicos como los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} . Uno de los papeles más ampliamente reconocidos del calcio en la función sináptica es su acción en la modulación y neurotransmisión sináptica. Los primeros estudios demostraron que la liberación de neurotransmisores por las uniones neuromusculares de los vertebrados era dependiente de la concentración de iones Ca^{++} en el medio. Estudios a nivel sináptico mostraron que los efectos del Ca^{++} en la neurotransmisión no eran secundarios a efectos del Ca^{++} en el potencial de acción presináptico sino que dependían directamente de la entrada de calcio en la terminal nerviosa. El papel del Ca^{++} en el acoplamiento estímulo - secreción ha sido también demostrado en otros tejidos.

El Ca^{++} está además implicado en la facilitación de la respuesta de receptores a agentes activos sobre la membrana. De un modo similar, el calcio juega un papel esencial en proporcionar nutrientes a la célula siendo un modulador positivo de endocitosis y flujo axoplasmático. El Ca^{++} también participa

positivamente en la proliferación celular al regular la síntesis de DNA y la actividad mitótica en concierto con otros mediadores celulares.

A otro nivel, el Ca^{++} es no solo crucial para permitir a las células adherirse unas a otras sino que la deprivación de calcio causa que las células no se acoplen comprometiendo su habilidad para comunicarse unas con otras. Esta comunicación intercelular es vital para optimizar la función celular al facilitar el intercambio de iones y macromoléculas a través de las uniones abiertas.

Pero tan importante como es el calcio en iniciar y mantener la actividad celular puede ser también un posible mediador en la lesión y muerte celular. El mecanismo de acumulación de Ca^{++} por las mitocondrias es sensible a la isquemia, lo que puede constituir un insulto primario durante la lesión celular al incrementarse la concentración de Ca^{++} iónico libre a niveles tóxicos. Por otro lado, una consecuencia de la injuria celular puede incluir un incremento en la permeabilidad de la membrana al calcio. Por tanto se requieren mecanismos intracelulares de tamponamiento del calcio para impedir que éste se acumule a niveles intolerables para la célula. Así el calcio celular es mantenido a niveles extremadamente bajos libre en el citoplasma por varios mecanismos incluyendo ATPasas dependientes de energía. A través de ellos el Ca^{++} queda unido a aniones y macromoléculas o incorporado a estructuras intracelulares como las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Estos depósitos intracelulares no solo sirven como mecanismo de tamponamiento del calcio sino también como reservorio para la movilización del Ca^{++} durante la activación celular.

1.4.2. CALCIO Y OTROS EFECTORES BIOQUIMICOS EN LA REGULACION DE LA FUNCION CELULAR.

(Schwartz,1985b; Rasmussen y cols.,1985a; Dolphin,1987; Nishizuka,1988; Eberhard y Holz,1988; Nahorsky,1988; Huang,1989; Birnbaumer,1990; Hansson y cols.,1990; Sternweis,1990).

Se acepta que el cAMP (adenosina monofosfato cíclico) y el Ca^{++} son importantes mensajeros intracelulares en la actividad de hormonas y neurotransmisores.

El cAMP es generado en un único lugar de la célula, la membrana plasmática y por un único enzima, la adenilato ciclasa (AC). El origen es una proteína acopladora que liga guanosina trifosfato (GTP) o guanosina difosfato (GDP) y, por tanto, se llama proteína G. Cuando el transmisor se une al receptor y el complejo resultante se asocia con la proteína G, el GTP desplaza al GDP en el sitio del nucleótido sobre el transductor. La proteína G entonces se asocia con la subunidad catalítica de la AC de modo que ésta es estimulada a catalizar la conversión de ATP (adenosina trifosfato) a cAMP. El complejo GTP-proteína G y la subunidad catalítica de la AC constituyen juntos la forma activa de la AC.

Cuando está asociada con la subunidad catalítica, la proteína G actúa como una GTPasa hidrolizando su GTP a GDP. Como resultado la proteína G se disocia de la subunidad catalítica y cesa la síntesis de cAMP. (Fig. 4)

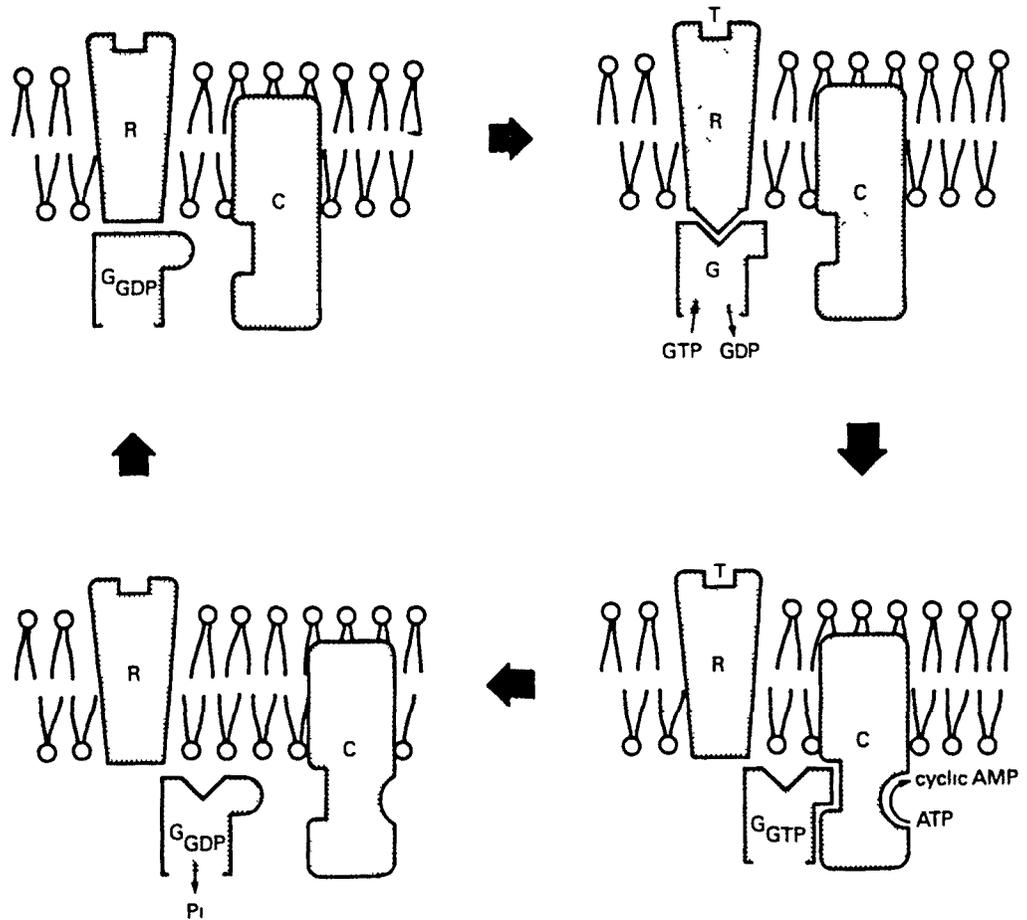


Fig. 4. Síntesis de AMP cíclico que resulta cuando el transmisor (T) se une al receptor (R) (Schwartz, 1985).

Las proteínas transductoras actúan para amplificar la pequeña señal sináptica en un número mucho mayor de complejos ciclasa activados necesarios para catalizar la síntesis de una concentración efectiva de cAMP dentro de la célula. Una amplificación ulterior ocurre en la reacción proteín quinasa (PK) que es el siguiente paso en la cascada de cAMP. El cAMP activa su proteín quinasa dependiente al causar la disociación de sus dos subunidades reguladoras (R) de las subunidades catalíticas (C).

Cuando está combinado, el complejo tetramérico quinasa R₂C₂

es inactivo enzimáticamente. Cuando son activadas las subunidades catalíticas funcionan como tales para fosforilar substratos proteicos. La introducción de un grupo fosfato cargado altera la conformación de una proteína y por tanto puede modificar la función de un enzima, una proteína reguladora o una subunidad de un canal iónico.

Otro segundo mensajero importante es el calcio. En este sistema se distinguen dos vías: la vía calcio - calmodulina ($\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$) por un lado y la vía de la proteína quinasa C (PKC) activada por diacilglicerol (DAG) por el otro. Si solo se activa una de las dos al máximo, se observa únicamente una respuesta celular submáxima pero si ambas son activadas se ve una respuesta máxima.

Estos datos implican que algún flujo de información en ambas vías es esencial para la respuesta celular máxima, de modo que la verdadera función de estas dos ramas sería conseguir una integración temporal de la respuesta celular.

Los sucesos en el sistema mensajero del calcio son mucho más complicados y plásticos que en el caso del cAMP. Cuando un mensajero interacciona con el receptor, que esta ligado por medio de una proteína G a una fosfoinositidasa C o fosfolipasa C (FLC) (que actúa sobre los fosfolípidos inositoles en la parte interna de la membrana), se produce la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (4,5PI). Los productos inmediatos son D-mioinositol(1,4,5)-trifosfato (1,4,5IP3) y sn(1,2)-diacilglicerol (DAG).

El IP3 puede ser metabolizado por dos vías separadas. Una es su defosforilación a 1,4IP2 y subsiguientemente a inositol libre que se considera una vía sin papel funcional. La otra vía es su

fosforilación a IP4 que parece tener importancia funcional. Este paso enzimático puede ser activado a su vez por $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ en el cerebro. El sinergismo de los dos inositoles fosfato se relaciona con la recarga de un depósito de Ca^{++} sensible al IP3 por un mecanismo regulado por el IP4, quizás involucrando movimiento de Ca^{++} a través de la membrana plasmática. Se ha visto que solo la presencia de ambos polifosfatos puede mantener una corriente de K^+ activada por Ca^{++} . Se habla de que un posible papel del metabolismo de fosfoinositoles mediado por receptor en la función neuronal es la modulación de corrientes iónicas responsables de la excitabilidad de la membrana. Hay la posibilidad de que un lugar de acción importante de este segundo mensajero en el SNC sea dentro de las terminales en las que la regulación del nivel de reposo del Ca^{++} intracelular puede influenciar la secreción umbral de transmisor evocada por Ca^{++} entrando por canales sensibles al voltaje.

Siguiendo al descubrimiento del IP4, la búsqueda de derivados de inositol más fosforilados ha conducido a la identificación del IP5 y el IP6 en el cerebro de mamíferos cuyo significado funcional se desconoce. (Fig. 5)

El IP3 produce una liberación de Ca^{++} de uno o unos depósitos intracelulares. Como consecuencia, la concentración de Ca^{++} libre se eleva lo que conduce a la modulación de un número de enzimas dependientes de Ca^{++} . Algunos son activados directamente por el Ca^{++} , como la glicerol oxidasa mitocondrial. Otros, son activados al unirse el Ca^{++} a la CaM. La CaM, a su vez, puede alterar la actividad de los elementos respuesta por medio de la activación alostérica directa del enzima o de proteín quinasas (PK). Estas PK reguladas por la CaM catalizan la fosforilación de un grupo

de proteínas celulares. Las fosfoproteínas resultantes regulan otros sucesos celulares. El flujo de información a través de esta vía de CaM conduce a la respuesta celular. Además de la activación directa de la fosfolipasa C mediada por receptor, también puede ser activada por incremento de Ca^{++} intracelular a través de canales modulados por receptor o por voltaje, generándose los mismos segundos mensajeros, IP3 y DAG.

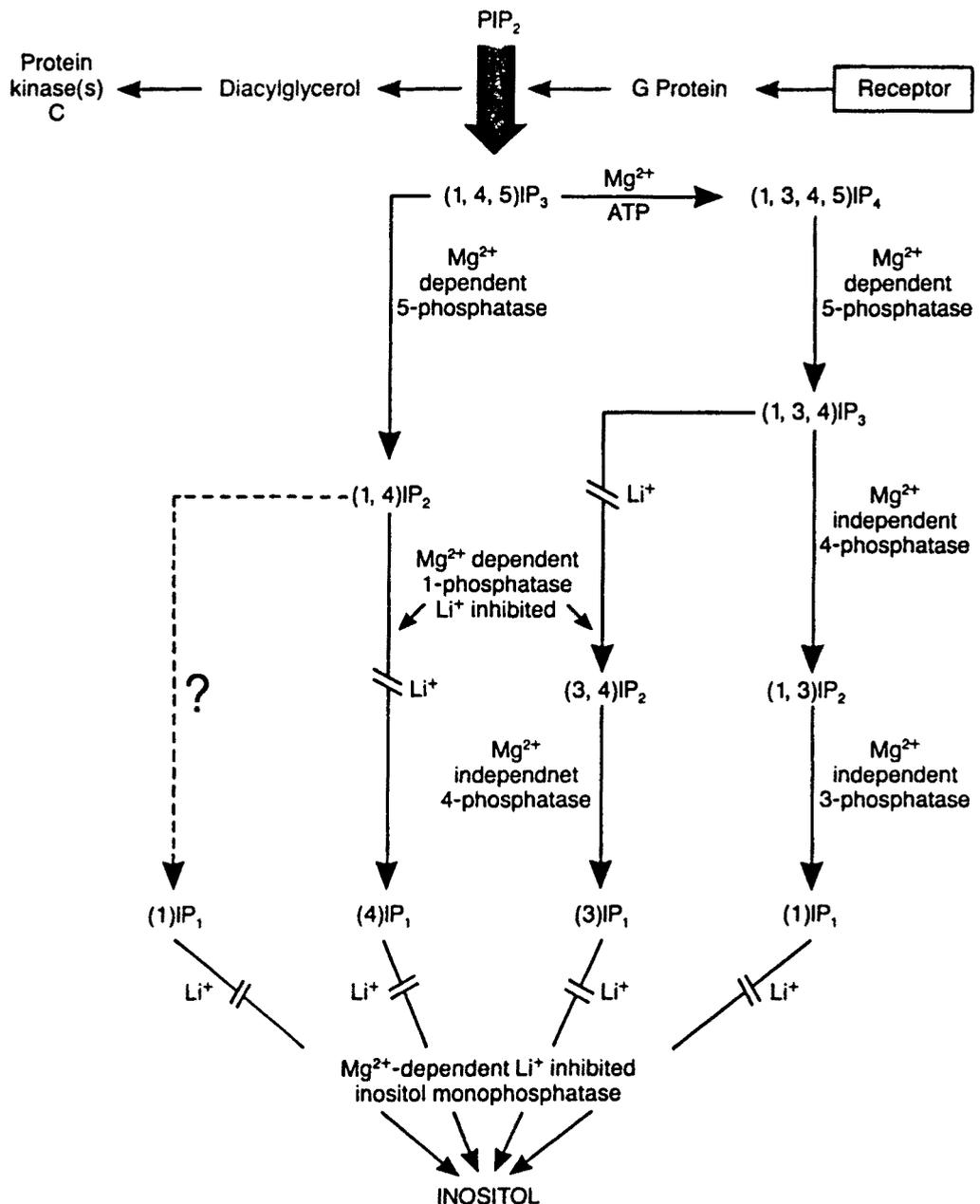


Fig. 5. Síntesis y metabolismo de (1,4,5)IP₃ y (1,3,4,5)IP₄ (Nahorski, 1988).

Por su parte, el incremento de DAG conduce a la activación de proteínas quinasas dependientes de Ca^{++} que reciben el nombre genérico de proteína quinasa C (PKC) y que catalizan la fosforilación de un grupo de proteínas. Estas proteínas fosforiladas regulan también sucesos celulares. El flujo de información a través de la quinasa C es responsable del mantenimiento de la respuesta celular sostenida. Cuando la quinasa C está aislada es activada ligeramente por elevadas concentraciones de Ca^{++} , lo que significa que es virtualmente inactiva en una célula no activada.

Además el DAG es una de las fuentes de ácido araquidónico que sirve a su vez como sustrato para la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y/o tromboxanos que pueden tener papeles mensajeros en sí mismos o, más probablemente, actuar como moduladores.

Es decir, los datos en estos sistemas indican que la rama calmodulina del sistema mensajero del Ca^{++} esta involucrada en iniciar la respuesta celular y la rama quinasa C en sostener esa respuesta.

Ahora bien, la presentación de estos dos sistemas mensajeros principales, cAMP y calcio, como vías separadas de flujo de información desde la superficie al interior celular puede ser útil desde un punto de vista didáctico pero equívoco desde un punto de vista biológico porque se ha visto claro que el Ca^{++} y el cAMP se comportan como mensajeros interrelacionados aunque no se expresan todas las posibles interacciones en cada célula. Los sucesos de los sistemas mensajeros del Ca^{++} están íntimamente relacionados con los del cAMP para, a través de la integración

de las señales que llegan a la célula, obtener la elaboración de una respuesta coordinada.

1.4.3. ATPasa DEPENDIENTE DE CALCIO Y SISTEMA DE INTERCAMBIO CALCIO-SODIO.

(Schatzmann,1985; Michaelis y Michaelis,1985; Baum y cols.,1988; Verma y cols.,1988; Blaustein,1988).

Una vez el calcio ha actuado debe ser eliminado. Pero no solo tiene que ser eliminado el Ca^{++} que ha entrado en el citosol durante la activación sino que hay en todas las células un influjo neto de reposo de Ca^{++} que debe ser equilibrado por un eflujo igual si se quiere mantener el gradiente de Ca^{++} a través de la membrana plasmática. Las organelas de almacenamiento pueden eliminarlo a corto plazo pero a largo plazo solo los sistemas exportadores de Ca^{++} mantendrán el citosol libre de un exceso del mismo.

Las neuronas como muchos otros tipos de células, tienen dos mecanismos paralelos e independientes en sus membranas plasmáticas que expulsan Ca^{++} desde el citosol al medio extracelular. Son el sistema de intercambio Na^{+}/Ca^{++} y las ATPasas dependientes de Ca^{++} . El sistema de intercambio parece difuso en células animales y las ATPasas están presentes no solo en células animales sino también en plantas y en células procariotas.

Las ATPasas Ca^{++} dependientes tienen una alta afinidad por el calcio pero una capacidad de transporte pequeña. En cambio, el sistema de intercambio Na^{+}/Ca^{++} tiene una menor afinidad por el Ca^{++} pero mucha mayor capacidad de transporte.

En las terminales nerviosas parecen estar presentes ambos tipos de sistemas exportadores de Ca^{++} en lugares en donde la liberación del transmisor depende de la entrada de Ca^{++} durante el potencial de acción.

ATPasas dependientes de calcio.

Se han identificado dos clases generales de ATPasas calcio dependientes, las localizadas en la membrana plasmática, que ayudan a expulsar Ca^{++} de las células y las localizadas en el sistema retículo endoplasmático que participan en el secuestro de Ca^{++} intracelular.

Las ATPasas dependientes de Ca^{++} de la membrana plasmática están moduladas por CaM, muestran una proporción de acoplamiento de un ión de Ca^{++} /una molécula de ATP y tienen un peso molecular de 140 kDa. Hay dos sitios para el ATP con diferente afinidad. Un lugar de alta afinidad que es propiamente el lugar enzimático, y un lugar de baja afinidad que media una actividad estimuladora del ATP. Al menos a 37°C (en presencia de CaM) el sitio de baja afinidad requiere Mg^{++} -ATP más que ATP libre.

La proteína de esta ATPasa ha sido aislada del resto de las proteínas de membrana. El sistema es activado por Ca^{++} /CaM mediante una interacción directa de la CaM con la proteína más que por un proceso de fosforilación dirigido por la CaM (Verma y cols., 1988). La CaM tiene un peso molecular de 170 kDa y contiene 148 aminoácidos y 4 territorios ligadores de Ca^{++} . Cuando se une a éste sufre una variación conformacional que resulta en la exposición de un sitio fijador hidrofóbico por medio del cual interacciona con los enzimas que activa. Este

territorio hidrofóbico es también el lugar en que actúan los compuestos que inhiben la acción de la CaM.

A concentraciones fisiológicas de CaM y Ca^{++} (y Mg^{++}) no hay interacción entre la CaM y la ATPasa. Un incremento abrupto de la concentración de Ca^{++} dentro de la célula inducirá el lento ensamblaje del sistema, la CaM resulta modificada y, por tanto, se une a la ATPasa con lo que incrementa la afinidad de ésta para el Ca^{++} en el sitio de transporte unas 30 veces, resultando en una activación con un intervalo de tiempo tal que pulsos cortos de entrada de Ca^{++} dentro de una célula darán una señal prolongada de la concentración de Ca^{++} intracelular.

No es seguro si la proteína esta presente dentro de la membrana como un monómero, un dímero o un oligómero. Pero los estudios realizados favorecen un dímero. En ausencia de CaM parte de este dímero funcional forma agregados mayores que son inertes.

Existen unos miles de ATPasas por célula con un recambio máximo de varios miles de ciclos de transporte por minuto. Exceptuando al estroncio (Sr^{++}) ningún otro catión se ha visto que sea transportado por el sistema. En cada ciclo participan 2 iones de Ca^{++} mientras que no hay indicación de que esté involucrado más de un ión Mg^{++} .

Tanto el Na^+ como el K^+ ejercen su efecto en el lado interno de la membrana. Esta excluida la posibilidad de que el Na^+ sea cotransportado por la ATPasa dependiente de Ca^{++} .

La cuestión que surge es si el Ca^{++} es transportado como tal o en intercambio por otro catión o como un par Ca^{++} -anión. Parece que hay una importante evidencia en favor de un intercambio Ca^{++} - H^+ pero no se sabe el número de iones que se intercambian (Baum y cols., 1988).

Las ATPasas dependientes de Ca^{++} del retículo endoplasmático son insensibles a la CaM, tienen una proporción de acoplamiento de dos iones Ca^{++} /una molécula de ATP y pesos moleculares de 105 kDa.

Sistema de intercambio Na^+ - Ca^{++} .

Durante mucho tiempo los fisiólogos conocían que el Na^+ y el Ca^{++} se antagonizan entre sí en los sistemas biológicos al parecer en algún receptor común. Luego se vió que existe una proteína de membrana que intercambia Ca^{++} por Ca^{++} ó Ca^{++} por Na^+ a través de la membrana. Este sistema no depende directamente de la energía metabólica disponible sino que utiliza el gradiente existente de Na^+ a través de la membrana neuronal. El Ca^{++} externo acelera el eflujo de Na^+ y el Na^+ externo acelera el eflujo de Ca^{++} . El Ca^{++} interno acelera el influjo de Na^+ y el Na^+ interno acelera el influjo de Ca^{++} . Se asume que la molécula transportadora tiene dos tipos de centros de unión mirando a lados opuestos de la membrana que se mueven cuando el sitio del Na^+ está cargado con Na^+ y el del Ca^{++} con Ca^{++} . Se postula una proteína asimétrica con 3 sitios de unión para el Na^+ en un extremo. Al saturarse estos sitios con Na^+ , se induce un lugar para el Ca^{++} en el extremo opuesto.

La unión del sistema con ATP incrementa la afinidad para el Na^+ y para el Ca^{++} .

Ya que existen ATPasas Na^+ - K^+ dependientes en todas las células animales que mantienen un gradiente de concentración de Na^+ extracelular / concentración de Na^+ intracelular mayor de 10 pero menor de 100, el sistema de intercambio Na^+ - Ca^{++} constituye

un medio de mantener el Ca^{++} intracelular bajo, mientras el Na^+ extracelular es alto. A una concentración de Ca^{++} intracelular fisiológica el sistema de intercambio contribuye, pero poco, al eflujo de Ca^{++} .

En un buen número de membranas celulares animales el sistema de intercambio actúa cuando la concentración de Ca^{++} intracelular es alta mientras que las ATPasas sirven para bajar la concentración de calcio intracelular al rango de 100 nM. Es importante para la célula mantener bajas las concentraciones intracelulares de calcio y de sodio y el sistema de intercambio acopla la ATPasa Na^+-K^+ y la ATPasa dependiente de Ca^{++} de tal modo que cada una sirve para expulsar Ca^{++} o Na^+ resultando en un mínimo de la suma Ca^{++} intracelular más Na^+ intracelular. Finalmente, cuando hay despolarización de la membrana, el sistema de intercambio incrementará la concentración de Ca^{++} intracelular, mientras que la ATPasa no será afectada por la despolarización o incluso aumentará su frecuencia.

1.4.4. CALCIO INTRACELULAR Y SU MOVILIZACION.

(Rasmussen, 1985b; Meldolesi y cols., 1988; Blaustein, 1988).

Un exceso de calcio intracelular conduce a disfunción celular y a la muerte celular. Por tanto una de las principales necesidades celulares es el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{++} celular.

Esto se consigue por un sistema de dos componentes: membrana plasmática y membrana mitocondrial interna. Existe un gradiente de concentración de Ca^{++} de 10000 veces a través de la membrana plasmática (Ca^{++} extracelular = 1000 μM ; Ca^{++} intracelular = 0.1

μM) pero el mantenimiento de este enorme gradiente es conseguido por el gasto de menos del 1% de la energía basal de la célula.

Durante la activación celular aumenta 4-5 veces la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{++} . La distribución del calcio en los diversos compartimentos subcelulares en neuronas y células neurosecretoras es la siguiente:

Citoplasma, contiene diversos aniones capaces de ligar calcio como el citrato, los nucleótidos y los inositolfosfatos. Por otro lado, la unión de calcio de alta afinidad se realiza con varias proteínas específicas como la calmodulina o la parvalbúmina, entre otras.

Núcleo, en las neuronas se ha encontrado que el contenido de Ca^{++} nuclear es tan alto como el promedio del contenido celular. Como sucede en el citoplasma la mayoría de Ca^{++} esta ligado y puede estar involucrado en varias funciones importantes como la regulación de la expresión genética.

Retículo endoplasmático (RE), las vacuolas de superficie lisa, los túbulos y las cisternas, identificados usualmente como RE están involucrados claramente en el control de la homeostasia del Ca^{++} en las células nerviosas. Pero la complejidad del RE es mayor de lo supuesto previamente. Solo una o algunas de las organelas que componen el RE son responsables de las actividades previamente atribuidas a la estructura en conjunto. Así, hay una clase de vacuolas lisas adyacentes al RE, llamadas calciosomas que poseen una $\text{Ca}^{++}/\text{ATPasa}$ y que han sido poco estudiadas en neuronas.

El RE tiene un papel importante en secuestrar Ca^{++} siguiendo a la actividad neuronal, especialmente en las terminales nerviosas. Pero la máxima velocidad a la que puede secuestrar el

cación es solo 0.1-0.2 pmoles/mg proteína/mseg, lo que es demasiado lento para explicar la velocidad de retirada del Ca^{++} del citosol requerida para terminar la liberación del transmisor inmediatamente después del potencial de acción, si el Ca^{++} entra a una velocidad de 5 pmol/mg proteína/mseg. Por tanto los tampones citosólicos deben actuar en una escala de tiempo de 1 mseg y servir como el mecanismo inicial para tamponar el incremento transitorio en el Ca^{++} intracelular. Entonces el RE es capaz de secuestrar el calcio más despacio, en una escala temporal de varios msecs.

Mitocondrias, tienen una gran capacidad para acumular calcio, pero no lo secuestran cuando el Ca^{++} intracelular se mantiene dentro del rango fisiológico (0.1-1 μM) porque su afinidad por el Ca^{++} y velocidad de captación del mismo son muy bajas en condiciones fisiológicas normales. Pero incluso con una baja afinidad por el Ca^{++} pueden captar pequeñas cantidades cuando el Ca^{++} intracelular se incrementa durante la actividad neuronal.

En condiciones normales el Ca^{++} intramitocondrial es un mediador del metabolismo oxidativo de la mitocondria a través de sus efectos en los enzimas clave. Por ello el metabolismo oxidativo mitocondrial y por tanto el aporte de ATP podría ser estimulado para atender las demandas incrementadas de ATP que se asocian invariablemente con la estimulación de los procesos promovidos por incrementos en el calcio citosólico (McCormack y cols., 1990).

Sin embargo, cuando la concentración intracelular de Ca^{++} excede 5 μM (es decir en condiciones patológicas), las mitocondrias secuestrarán cantidades importantes de Ca^{++} .

Vesículas sinápticas y gránulos neurosecretorios, también

secuestran calcio por un mecanismo dependiente de ATP, pero tienen una baja afinidad por el Ca^{++} y probablemente no contribuyan mucho a la regulación del Ca^{++} intracelular. El calcio de estas organelas juega un papel local, posiblemente relacionado con el almacenamiento del neurotransmisor.

1.4.5. FOSFORILACION PROTEICA REGULADA POR CALCIO EN EL CEREBRO DE MAMIFEROS.

(Walaas y Nairn, 1985; Kennedy, 1989).

Los sistemas de fosforilación proteica consisten en su forma más simple en 3 componentes: una proteína quinasa (que cataliza la incorporación de fosfato desde un donante de fosfatos, usualmente ATP), un sustrato proteico (que liga el fosfato sobre los residuos de serina, treonina o tirosina) y una fosfoproteína fosfatasa (que elimina el fosfato del sustrato).

Los sistemas de fosforilación dependientes del Ca^{++} en el cerebro muestran diferencias marcadas en las propiedades bioquímicas y tienen diferentes localizaciones celulares y regionales. Muchas de las características moleculares de las proteínas quinasas dependientes de Ca^{++}/CaM y de la proteína quinasa C ya están descritas pero la naturaleza de los sustratos de estos enzimas no está bien caracterizada.

En un principio se creyó que la mayoría de fosforilación proteica dependiente de Ca^{++} estaba controlada por la CaM. Posteriormente, sin embargo, se encontró una proteína quinasa dependiente de Ca^{++} y fosfolípidos en elevadas concentraciones en el cerebro así como en otros tejidos.

Se han caracterizado varias proteínas quinasas dependientes de

Ca⁺⁺/CaM en el cerebro de mamíferos y un grupo de proteínas quinasas dependientes de Ca⁺⁺/fosfolípidos que reciben el nombre genérico de proteína quinasa C.

La fosforilación proteica dependiente de Ca⁺⁺/CaM parece ser particularmente importante en el cerebro: los niveles de la actividad proteína quinasa dependiente de Ca⁺⁺/CaM son muy altos y se ha descubierto un gran número de substratos específicos.

Dos de los principales substratos para la fosforilación proteica dependiente de Ca⁺⁺ en los sinaptosomas son las sinapsinas Ia y Ib, llamadas colectivamente sinapsina I. Se encuentran solo en el tejido nervioso, en todas las terminales nerviosas, y parecen estar asociadas con la superficie externa de las vesículas sinápticas. Son substratos para la proteína quinasa dependiente de cAMP y para una proteína quinasa dependiente de Ca⁺⁺/CaM en el sitio I (quinasa I) y una proteína quinasa dependiente de Ca⁺⁺/CaM en el sitio II (quinasa II).

La localización específica de la proteína en la superficie externa, citoplasmática, de las vesículas sinápticas sugiere su involucración en el proceso de exocitosis. Al ser fosforilada se reduce la afinidad de la sinapsina I por las vesículas lo que causaría la liberación de vesículas del citoesqueleto convirtiéndolas en disponibles para la fusión inmediata durante la despolarización. El hecho de que el sitio I de la proteína sea fosforilado tanto por la quinasa I como por la quinasa dependiente de cAMP podría indicar que la fosforilación de esta parte de la proteína es una vía final común a través de la que aquellos transmisores que trabajan incrementando el cAMP y aquellos estímulos que conducen a un incremento en el Ca⁺⁺ podrían afectar la función de la vesícula sináptica y facilitar

la liberación del neurotransmisor en la sinapsis. La quinasa II es capaz de autofosforilarse de un modo dependiente de Ca^{++} . Ambas son probablemente dos de las principales proteínas quinasas dependientes de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ en el cerebro.

La quinasa I se halla en elevadas concentraciones en el cerebro y en los tejidos, y en la neurona, en todas las partes de la misma. Ya que la sinapsina I está solo en la terminal nerviosa, la amplia distribución de la quinasa I sugiere la existencia de substratos fisiológicos adicionales. La quinasa II se encuentra en concentraciones elevadas en el cerebro, solamente en las neuronas, en el citosol de los cuerpos celulares, dendritas, axones y terminales, pero parece especialmente concentrada en las densidades postsinápticas. En la terminal presináptica, la quinasa II puede mediar una forma de facilitación de la transmisión sináptica.

Dos substratos adicionales de la $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ son los isoenzimas de la AC y de la fosfodiesterasa, los enzimas que catalizan respectivamente la síntesis y degradación del cAMP. Por tanto un incremento en la concentración de Ca^{++} en un lugar particular de la célula, puede o aumentar o disminuir la producción de cAMP.

También la $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ participa en el control de la concentración de Ca^{++} al activar la ATPasa dependiente de Ca^{++} de la membrana. Otras proteínas quinasas dependientes de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ que se han localizado en el cerebro, son: la quinasa de la cadena ligera de miosina y la fosforilasa quinasa.

La activación de la proteína quinasa C, por su parte, no depende de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$, pero sí del Ca^{++} aunque los mecanismos exactos por los que el Ca^{++} , los fosfolípidos y el DAG la activan no se conocen.

Hay varias proteínas que son fosforiladas por la quinasa C como la proteína 87000 y la B50. La primera puede estar involucrada en la modulación dependiente de Ca^{++} de la liberación de neurotransmisores en el SNC y la segunda parece estar asociada con membranas plasmáticas presinápticas, posiblemente como una proteína de membrana integral. Su fosforilación puede estar involucrada en la modulación de la transmisión de señal ligada al fosfatidilinositol.

La proteína básica de la mielina es fosforilada in vivo en numerosos sitios. La mielina contiene pequeñas cantidades de proteína quinasa dependiente de cAMP. La mielina cerebral contiene además una quinasa C muy activa que fosforila la proteína básica y cuyo significado funcional es desconocido.

Los microtúbulos están presentes por toda la célula nerviosa, tanto en asociación con membranas postsinápticas como en terminales presinápticas. Los microtúbulos consisten en tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos. Tanto unas como otras son fosforiladas, tanto por las quinasas dependientes de Ca^{++}/CaM como por la proteína quinasa C y la quinasa dependiente de cAMP.

La fosforilación regulada por Ca^{++} puede representar mecanismos importantes para el control del ciclo del ensamblaje-desensamblaje de los microtúbulos.

La tirosina hidroxilasa (TH) es el enzima catalizador del paso limitante de velocidad en la síntesis de los neurotransmisores catecolaminérgicos, dopamina, noradrenalina y adrenalina. Está localizada específicamente en neuronas catecolaminérgicas y células cromafines. Es un enzima que responde a varias moléculas señal que modulan rápidamente su eficacia catalítica. Es fosforilada por un mecanismo dependiente de cAMP que conduce a

un incremento de su actividad. Hay, además dos mecanismos posibles por los que la fosforilación dependiente de Ca^{++} puede regular el enzima. Uno es la fosforilación del enzima por la quinasa II dependiente de Ca^{++}/CaM que no cambia las propiedades del enzima pero permite que una proteína lo active. Dicha proteína ha sido purificada y caracterizada y no parece estar localizada específicamente en células productoras de catecolaminas sino que se encuentra como una proteína abundante por todo el cerebro y varios órganos periféricos. Ya que la quinasa II también esta distribuída por el cerebro mientras que la TH esta restringida a las neuronas catecolaminérgicas, la especificidad de este mecanismo de activación puede ser cuestionado.

El otro mecanismo se ha encontrado en células cromafines adrenales en que la proteína quinasa C esta involucrada en la mediación de la activación de la TH inducida por acetilcolina. Esta activa el enzima estimulando de un modo dependiente de Ca^{++} la fosforilación de 2 ó más sitios en la proteína, uno de los cuales es diferente del fosforilado por la proteína quinasa dependiente de cAMP.

De todos modos parece que la inactivación del enzima por catecolaminas y su activación por la proteína quinasa dependiente de cAMP podrían ser los mecanismos más importantes en controlar su actividad (Fujisawa y Okuno,1989). La fosforilación dependiente de Ca^{++}/CaM activa el enzima en caso de despolarización y esta activación es aditiva a la debida al proceso de fosforilación dependiente de cAMP (El Mestikawy,1983).

Hay evidencia de que la triptófano hidroxilasa también es regulada por fosforilación dependiente de Ca^{++}/CaM . Es posible

por tanto que la fosforilación dependiente del Ca^{++} de los enzimas sintetizadores de transmisores puede representar un mecanismo regulador común.

Aunque la fosforilación proteica dependiente de Ca^{++} se cree que es regulada predominantemente por activación de proteínas quinasas, el Ca^{++} también regula el estado de fosforilación de proteínas por activación de fosfoproteínas fosfatasas. La calcineurina es una fosfoproteína dependiente de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$. Es abundante en el cerebro pero tiene una especificidad de sustrato bastante limitada. Ha sido implicada en la inactivación dependiente de Ca^{++} de los canales de calcio voltaje dependientes de tipo L en las neuronas. La fosforilación de estos canales por la proteína quinasa dependiente de cAMP incrementa su actividad por la despolarización. Por el contrario, su defosforilación los desensibiliza.

La calcineurina también defosforila e inactiva la DARPP-38, un inhibidor proteico de una fosfatasa de amplia especificidad en el cerebro, de modo que la activación de la calcineurina puede iniciar una cascada de defosforilaciones proteicas.

1.4.6. CONTROL POR CALCIO DE LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES.

(Silinsky,1985; De Lorenzo,1985; Smith y Augustine,1988; Knight y cols.,1989; Verage,1989).

Uno de los papeles más ampliamente reconocidos del Ca^{++} en la función sináptica es su acción en la modulación sináptica y en la neurotransmisión. La liberación del neurotransmisor depende de la concentración del Ca^{++} en el medio. Los efectos del Ca^{++} sobre la neurotransmisión son dependientes directamente de la

entrada de Ca^{++} en la terminal.

Aunque la localización del objetivo molecular para la acción del Ca^{++} es desconocida, la rapidez con la que puede desencadenarse la liberación (en aproximadamente 0.1-1 mseg después del influjo de Ca^{++}) hace posible que el Ca^{++} actúe a muy poca distancia del canal de calcio. Durante los potenciales de acción, el Ca^{++} puede incrementarse en unos pocos cientos de microsegundos a concentraciones de 100 μM o más, volviendo a niveles submicromolares con la misma velocidad. Tal rapidez es adecuada para la puesta en marcha rápida y sincrónica de la liberación del neurotransmisor y se debe a la gran densidad de canales de Ca^{++} próxima a las zonas de liberación (Blaustein, 1988).

La mayoría de canales de Ca^{++} son de reserva. Solo alrededor de un 10% de los sitios de unión de canales de Ca^{++} necesitan ser ocupados para producir una máxima secreción. Esto es debido a que la señal de inicio, no necesita ser grande para producir efectos máximos (secreción) debido a la enorme amplificación por la secuencia de intermediarios en la reacción que interviene entre unión y respuesta.

Aunque está bien establecida la función del Ca^{++} como un segundo mensajero en la función sináptica, una cuestión actual es cuál es el mecanismo molecular que media los efectos del Ca^{++} en la actividad sináptica.

Se piensa que la exocitosis es iniciada por la unión del Ca^{++} a una molécula localizada en el interior del citoplasma, sea en la membrana plasmática, sea en la membrana de las vesículas sinápticas y/o en el citoesqueleto. Aunque la identidad de esta molécula es desconocida, existen varias hipótesis.

Parece que dicho receptor tiene una menor afinidad por el Ca^{++} que la CaM, de modo que ésta no parece un buen candidato.

Se habla, además, de la posibilidad de que se forme temporalmente un poro de fusión por medio de una proteína al fusionarse las vesículas con la membrana plasmática (Almers y Tse, 1990). La atención se ha dirigido a la sinexina y otros miembros de la familia de las calelectrinas. Pero no es claro que estas proteínas tengan la selectividad apropiada para que cationes divalentes sean involucrados en la liberación. Por otro lado, parece que la p38 sinaptofisina tiene un papel funcional importante en las sinapsis que liberan transmisores de acción rápida, pero resulta especulativo si este papel es como receptor de Ca^{++} .

Se está acumulando evidencia en favor de interacciones vesícula-citoesqueleto regulando la disponibilidad de vesículas para exocitosis. La interacción con elementos del citoesqueleto es un medio potencial de proporcionar vesículas a los lugares de exocitosis y/o actuar como una barrera para impedir que las vesículas sufran exocitosis. Un elemento del citoesqueleto presente en las zonas de liberación es la sinapsina I. La fosforilación dependiente de Ca^{++} de la sinapsina puede modular la transmisión al regular la cantidad de transmisor disponible para ser liberado, quizás como consecuencia de alteraciones en la organización de citoesqueleto a nivel de la zona de liberación.

En conclusión, sigue sin saberse cómo se inicia la exocitosis una vez que la vesícula está disponible. Por un lado está la posibilidad de que el receptor de Ca^{++} desencadenante de la liberación medie directamente la exocitosis. Candidatos para este

papel serían la p38 sinaptofisina y miembros de la familia de las calelectrinas. Por otro lado está la posibilidad de que la liberación sea mediada por un mecanismo independiente de Ca^{++} una vez que el mecanismo activado por el receptor de Ca^{++} desencadenante supere las barreras del citoesqueleto.

1.4.7. TIPOS DE CANALES DE CALCIO Y SU MODULACION SELECTIVA.

(Quirion,1985; Greenberg,1987; Miller,1987; Hosey y Lazdunski,1988; Nayler,1988; Tsien y cols.,1988; Bean,1989b; Marty,1989; Kostyuk,1989; Godfraind y Govoni,1989).

1.4.7.1. Generalidades.

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana celular con el fin de proporcionar una ruta acuosa para el paso de iones cuyo carácter cargado impediría su movimiento a través del medio lipídico de la membrana. El flujo de iones es un proceso pasivo a favor de gradiente que requiere que los canales estén abiertos. Varios millones de iones de Ca^{++} /seg pueden entrar en las células a través de canales de Ca^{++} abiertos. Los canales de Ca^{++} son importantes en aportar Ca^{++} a muchos tipos de células, particularmente células excitadoras como las musculares y nerviosas donde se postula que juegan un papel en el acoplamiento excitación-contracción y la liberación de transmisores, respectivamente. Los canales de Ca^{++} están también presentes en células secretoras y otras células no excitables como linfocitos, espermatozoides, neutrófilos e incluso plantas.

Se encuentran en las membranas plasmáticas pero algunas formas

de canales de Ca^{++} están presentes también en membranas intracelulares donde tienen una función importante en el proceso de liberación del Ca^{++} desde los sitios de almacenamiento del interior de la célula.

La modulación de los canales puede ser conseguida en respuesta a, al menos, dos tipos de sucesos: cambios en el potencial de membrana (canales dependientes de voltaje) o en la función de receptores asociados al canal (canales modulados por receptor). En algunos casos aparecen ambos mecanismos.

Los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje se encuentran entre los canales iónicos más ampliamente distribuidos y antiguos en la evolución. Están presentes en músculo liso, cardíaco y esquelético, en células secretoras endocrinas, en neuronas, en glía y en oocitos. Se ha propuesto que los canales de Ca^{++} evolucionaron desde un canal primordial y no especializado y a su vez dieron lugar a los canales de Na^+ .

Los canales de Ca^{++} voltaje dependientes son los mejor caracterizados. La despolarización incrementa la probabilidad de apertura del canal resultando en una corriente de Ca^{++} hacia el interior celular. Pero los canales de Ca^{++} no son completamente selectivos. Ciertos cationes divalentes como el Ba^{++} y el Sr^{++} son preferidos sobre el Ca^{++} . El Na^{++} también puede pasar a través del canal. Otros cationes incluyendo La^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} bloquean el paso del canal de Ca^{++} e impiden al Ca^{++} entrar en las células.

Una variedad de neurotransmisores puede también estimular la entrada de Ca^{++} extracelular a las células, un fenómeno que ha sido estudiado con particular detalle en el músculo liso. En preparaciones neuronales, el incremento de la corriente de Ca^{++}

hacia el interior ha sido observado en respuesta a péptidos como la sustancia P y la calcitonina. Una variedad de aminoácidos excitadores incluyendo posibles neurotransmisores, estimulan el flujo de Ca^{++} dentro de cortes cerebrales y neuronas cultivadas. En la mayoría de casos, queda sin aclarar si los canales de Ca^{++} que median estos efectos son verdaderamente diferentes de los dependientes de voltaje. Una excepción es el canal de Ca^{++} activado por N-metil-D-ácido aspártico que puede ser distinguido por su gran sensibilidad al bloqueo por el Mg^{++} micromolar y su refractariedad al bloqueo por el Cd^{++} .

Además de promover el influjo de Ca^{++} extracelular, varios neurotransmisores incrementan la concentración de Ca^{++} libre en el interior de la célula al movilizar el Ca^{++} de los depósitos de almacenamiento intracelulares. La unión de estos transmisores a los receptores de la membrana celular estimula la hidrólisis enzimática del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para formar dos segundos mensajeros intracelulares: inositol 1,4,5-trifosfato, que provoca la liberación de Ca^{++} desde las organelas intracelulares al citoplasma y el diacilglicerol que activa la proteína quinasa C dependiente del Ca^{++} .

Los neurotransmisores y neuromoduladores que parecen emplear esta vía incluyen: acetilcolina (receptores muscarínicos), norepinefrina (receptor α_1), histamina (receptor H_1), serotonina (receptor 5HT_2), sustancia P, neurotensina, vasopresina y colecistoquinina.

1.4.7.2. Heterogeneidad del canal de Ca^{++} .

Se han identificado múltiples subtipos de canal de Ca^{++}

dependiente de voltaje en neuronas, músculo cardíaco, liso y esquelético, y en células hipofisarias. Las bases para distinguir entre subtipos de canales incluyen diferencias en el potencial de membrana al que son activados, en su tendencia a inactivarse y en su sensibilidad farmacológica.

En neuronas del ganglio de la raíz dorsal del pollo se distinguen tres tipos de canales de Ca^{++} (Nowycky y cols., 1985): L = larga duración o lentos. Activados por despolarizaciones fuertes. Relativamente resistentes a la inactivación. Muy sensibles al Cd^{++} y a las drogas agonistas y antagonistas del canal de Ca^{++} .

T = transitorios o rápidos. Activados por despolarizaciones débiles. Fácilmente inactivados. Menos afectados por el Cd^{++} . Insensibles a las drogas.

N = no L no T ó neuronales. Activados por fuertes despolarizaciones. Transitorios. Muy sensibles al bloqueo por el Cd^{++} . Resistentes a la modulación por drogas. (Tabla 1)

TABLA 1. Tipos de canales de calcio voltaje dependientes.

	Activación	Inactivación	Sensible a drogas
L	Despolarizaciones fuertes	Difícil	Si
T	Despolarizaciones débiles	Fácil	No
N	Despolarizaciones fuertes	Fácil	No

La existencia de múltiples subtipos de canales de Ca^{++} operados por voltaje puede estar relacionada con la diversidad de funciones que median en células neuronales, contráctiles y secretoras.

Uno o más tipos de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje pueden existir en un tipo particular de célula. Por ejemplo, en las neuronas sensitivas del ganglio de la raíz dorsal, coexisten los tres. En las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior hay L y N pero no T. En el músculo liso hay L y T.

Por otro lado, parece que diferentes tipos de canales de Ca^{++} están involucrados en la liberación de transmisores en sinapsis diferentes lo que puede tener consecuencias funcionales importantes para la liberación del transmisor. Así, los canales L regulan la liberación de transmisores en neuronas sensitivas de pollo y rata así como en terminales neurosecretoras de la hipófisis de rata, ratón y rana, mientras que los N son responsables de iniciar la liberación en las terminales nerviosas del cerebro de rata. Se ha propuesto que los canales N pueden estar involucrados en desencadenar la exocitosis de vesículas pequeñas, de centro claro, mientras que los L pueden regular la exocitosis de vesículas grandes, de centro denso (Smith y Augustine.,1988).

También puede haber subtipos de las diferentes variedades de canales voltaje dependiente ya que, por ejemplo, el canal de Ca^{++} de tipo L, presente en el corazón, difiere en ciertas propiedades farmacológicas y electrofisiológicas del tipo L del músculo esquelético y en otros aspectos del tipo L de las neuronas.

Hay otros canales iónicos que son operados a través de mecanismos dependientes de receptor, son los canales operados por

receptor y se abren o cierran en respuesta a la modulación de un receptor asociado. Pueden existir diferentes tipos de canales de Ca^{++} dependientes de receptor: los canales iónicos asociados a receptor que son permeables al Ca^{++} como los que están asociados con un subtipo particular de receptores de glutamato, los receptores NMDA, y los regulados por procesos dependientes de receptor, como proteínas ligadoras de GTP activadas por receptor (proteínas G) o procesos de fosforilación y defosforilación reversibles que ocurren en respuesta a modificaciones en los segundos mensajeros intracelulares dependientes de receptor.

Así, además de los mecanismos fundamentales gobernando su apertura y su cierre, un importante número de canales de Ca^{++} incluyendo canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, están sujetos a regulación por más de un mecanismo.

1.4.7.3. Regulación bioquímica de los canales de Ca^{++} .

Una gran variedad de neurotransmisores y drogas pueden afectar la actividad de las corrientes de calcio en las neuronas. Ciertos neurotransmisores estimulan el influjo de Ca^{++} extracelular a las neuronas. Otros neurotransmisores y neuromoduladores inhiben el influjo de Ca^{++} dependiente de voltaje, incluyendo la noradrenalina (receptor α_1), la dopamina, la serotonina, el GABA (receptor GABA B), los péptidos kappa opioides dinorfina y neoendorfina, la somatostatina, la adenosina y la prostaglandina E.

Los efectos inhibidores de los neurotransmisores en los canales de Ca^{++} neuronales parecen ser superiores a los estimuladores. Así la dopamina inhibe la corriente T porque

disminuye la posibilidad de apertura de los canales T.

En muchos casos, los tipos de canal de Ca^{++} individuales pueden ser modulados selectivamente. Así, la acetilcolina en las neuronas simpáticas de la rata y la adenosina en las neuronas del hipocampo de la rata producen una disminución de la corriente N pero no de la L ó T. En las neuronas simpáticas de la rana, la norepinefrina reduce la corriente N (vía receptores α) e incrementa la corriente L (vía receptores β). Las proteínas G están involucradas con frecuencia como intermediarias entre los receptores de neurotransmisores y los canales de calcio. En neuronas simpáticas derivadas del ganglio cervical superior de la rata recién nacida, la inhibición de la corriente de Ca^{++} mediada por receptor muscarínico / proteína G es debida a una inhibición selectiva de los canales N. Un canal L es inhibido por proteína G activada por neurotransmisor en neuronas del ganglio de la raíz dorsal del pollo.

En algunos casos, las proteínas G controlan enzimas que forman segundos mensajeros como el cAMP o el DAG. En otros casos, se han descrito interacciones físicas directas de las proteínas G con los canales de Ca^{++} .

Por otro lado, los tipos de células individuales parecen haber adaptado varios mecanismos de señalización. La fosforilación por diversas proteínas quinasas puede dar lugar a patrones diferentes de modulación del canal de Ca^{++} a nivel del propio canal. Es probable que aquéllas regulen los canales a través de fosforilación de proteínas que forman parte de, o están asociadas a los mismos. Así, en las neuronas sensitivas la proteína quinasa C ha sido implicada en la inhibición por la norepinefrina de las corrientes L y T.

Del mismo modo que la fosforilación de ciertos canales de Ca^{++} por proteínas quinasas modula la actividad del canal, se esperaría que la defosforilación por fosfoproteína fosfatasas revirtiese los efectos. En estudios bioquímicos se vió que la calcinerina defosforila la unidad 170 kDa del receptor de dihidropiridinas (DHP) del músculo esquelético fosforilado previamente por la proteína quinasa dependiente de cAMP o por la multifuncional dependiente de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$. Estos resultados sugieren que la calcinerina puede revertir efectivamente los efectos de la fosforilación dependiente de cAMP y/o de Ca^{++} de los canales L en células intactas. No se sabe qué pasa con los otros canales.

Obviamente el número de diferentes canales de Ca^{++} regulados por varios mecanismos involucrando muchos tipos diferentes de receptores, de neurotransmisores y de hormonas, segundos mensajeros, proteínas quinasas y proteínas es mucho más complicado de lo que se reflejó en los estudios originales de regulación de canales de Ca^{++} cardíacos por noradrenalina y acetilcolina.

1.4.7.4. Bioquímica y biología molecular del canal de calcio sensible a dihidropiridinas.

(Campbell y cols.,1988; Godfraind y cols.,1988; Hosey y Lazdunski,1988; Ahlijanian y cols.,1990).

El canal de Ca^{++} sensible a las dihidropiridinas (DHP) es el tipo L, no el T ni el N. Contiene al menos tres lugares diferentes, alostéricamente regulados, para bloqueantes del canal de Ca^{++} ya que son también inhibidos por fenilalquilaminas y benzodiazepinas. El receptor purificado se une con alta afinidad a las DHP, y esta unión está alostéricamente acoplada a sitios

para el verapamil y el diltiazem.

El receptor de DHP ha sido purificado tanto del músculo esquelético como del cerebro, mostrando una composición de subunidades similar en ambos tejidos.

Subunidad α_1 . Tiene una masa molecular de 175 kDa y posee muchas de las propiedades que se esperan del canal de Ca^{++} sensible a DHP ya que contiene los sitios para ligar estos bloqueantes del canal de Ca^{++} . Es un substrato para la proteína quinasa dependiente de cAMP, una proteína quinasa dependiente de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$, y la proteína quinasa C. Uno de sus segmentos podría ser el sensor de voltaje para los canales de Ca^{++} . Tiene un alto grado de homología con la subunidad α del canal de Na^+ .

Subunidad α_2 . Su masa molecular es de 145 kDa. Posiblemente consiste en un gran territorio extracelular y un pequeño territorio transmembrana. Los anticuerpos contra la α_2 no reaccionan con las subunidades α_1 , β ó Γ mostrando que es diferente a éstas. Ya que la α_2 no es fosforilada y no parece contener sitios de unión para las DHP o fenilalquilaminas, su papel funcional es desconocido.

Subunidad β . Tiene un peso molecular de 54 kDa. Es un substrato tanto para la proteína quinasa dependiente de cAMP como para la proteína quinasa C. La β se copurifica con la α demostrando una fuerte asociación entre ellas. Un anticuerpo monoclonal contra la unidad β es capaz de activar el canal Ca^{++} reconstituido. Este resultado y la fosforilación de la subunidad β sugiere que está involucrada en la regulación del canal de Ca^{++} .

Subunidad Γ . Es una glicoproteína de 30 kDa. Probablemente tiene territorios extracelulares y transmembrana. Anticuerpos

policlonales contra esta subunidad no reaccionan con las otras subunidades, indicando que es diferente de ellas y no un producto de degradación proteolítico de una subunidad mayor. Además estos anticuerpos inhiben la actividad del canal de Ca^{2+} sugiriendo que la Γ es una subunidad reguladora fuertemente asociada al canal de Ca^{2+} .

Subunidad δ . Parece consistir en una o más proteínas pequeñas de 24-27 kDa y contener una zona transmembrana. Está unida por un enlace disulfuro a la subunidad α_2 . No se conoce su función. (Fig. 6)

Los componentes proteicos del receptor DHP purificado existen como un único complejo que contiene los sitios de unión de las DHP, fenilalquilaminas, bepridil y benzodiazepinas. Múltiples receptores a drogas están presentes en el canal L y son modulados por muchos factores.

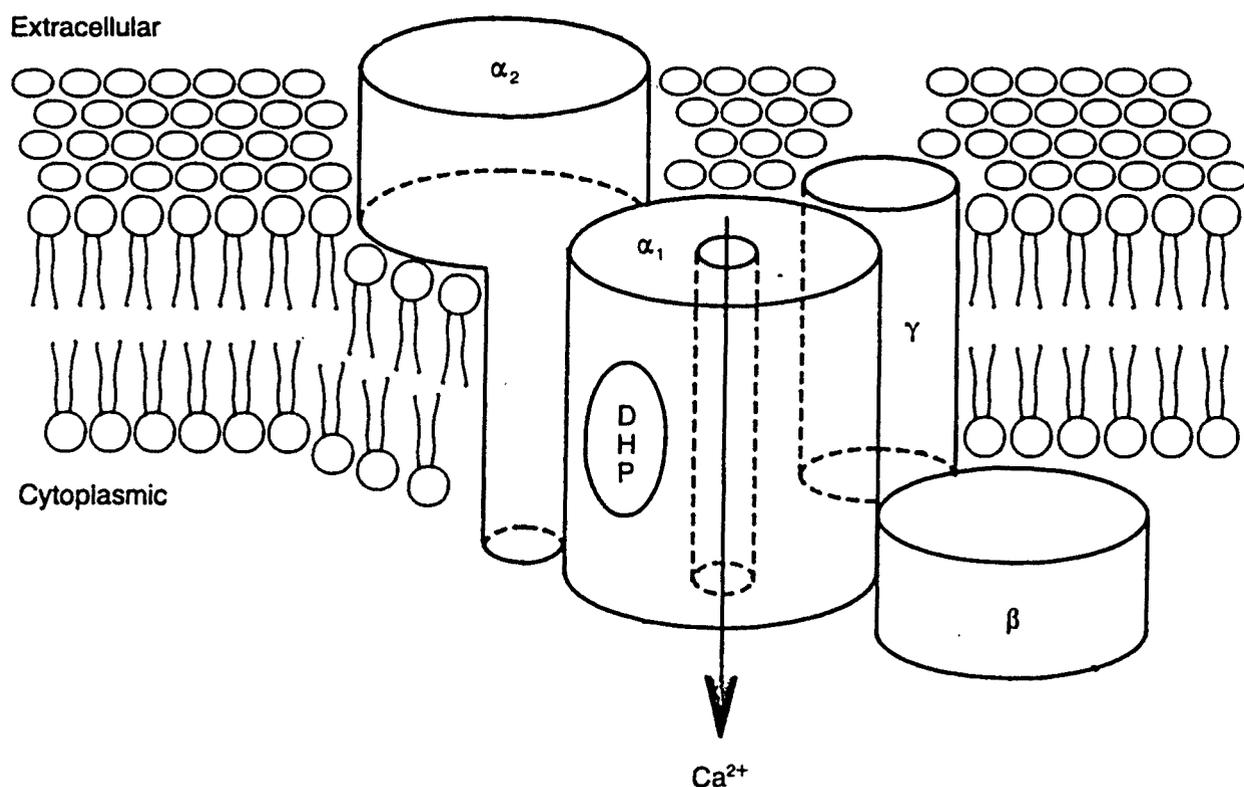


Fig. 6. Modelo del canal de calcio sensible a dihidropiridinas (Campbell y cols. 1988).

Las fenilalquilaminas y el bepridil parecen fijarse a un receptor común que es diferente del receptor de DHP. Las benzodiazepinas pueden ligarse al receptor fenilalquilamina / bepridil, o a un receptor separado que está acoplado alostéricamente al receptor fenilalquilamina. Parece ser que las fenilalquilaminas, el bepridil y las benzodiazepinas interaccionan competitivamente en los receptores del canal L.

Ahora bien, el hecho de que las benzodiazepinas estimulen la unión a DHP mientras que las fenilalquilaminas y el bepridil usualmente la inhiban, podría sugerir la presencia de un sitio de unión para las benzodiazepinas y otro para las fenilalquilaminas y el bepridil. Sitios de unión de alta y baja afinidad para las fenilalquilaminas han sido demostrados en membranas de músculo liso, esquelético y cardíaco y en el cerebro, y se ha sugerido que éstos pueden estar asociados diferencialmente con el receptor benzodiazepina.

Se ha identificado otro receptor en los canales L que liga neurolepticos de la serie difenilbutilpiperidina como el fluspirilene y el pimozide.

El receptor difenilbutilpiperidina en los canales L es diferente de, pero acoplado alostéricamente a, los receptores para las DHP y las fenilalquilaminas. Cuando se mide el número de sitios de unión, los receptores DHP, fenilalquilamina, benzodiazepina y difenilbutilpiperidina parecen estar presentes en una estoiquiometría 1=1=1=1. Así, hay al menos tres o cuatro (o quizás más) receptores de droga sobre el canal L que son diferentes pero capaces de interaccionar alostéricamente.

Así pues, el complejo del canal de Ca^{++} sensible a

dihidropiridinas está compuesto por cinco subunidades: α_1 , α_2 , β , γ y δ . La asociación de estas subunidades es muy fuerte, altamente específica y posiblemente necesaria para la unión de ligandos y actividad del canal de calcio.

1.4.7.5. Distribución de centros de fijación de antagonistas de canales de calcio en cerebro de rata.

Centros de fijación de dihidropiridinas (DHP).

El estudio de autorradiografía in vitro con marcadores 1,4 dihidropiridinas realizado por Cortés y cols. (1984) en cerebro de rata mostró la siguiente distribución de lugares ligadores de DHP:

Las mayores densidades se localizaron en el bulbo olfatorio y otros componentes del sistema olfatorio, así como en partes de la amígdala conectadas al sistema olfatorio. Otras zonas fueron: algunos componentes del sistema límbico como la capa molecular del gyrus dentato del hipocampo y áreas telencefálicas como el neocórtex, los ganglios basales (exceptuando el núcleo pálido) y el tálamo. En el tronco y bulbo hubo bajas densidades con excepción del núcleo del nervio facial y del núcleo del tracto solitario y el cerebelo presentó densidades intermedias en la capa de células granulosas.

El estudio inmunocitoquímico debido a Ahlijanian y cols. (1990) marcó canales de Ca^{++} sensibles a DHP a todo lo largo de la extensión rostro-caudal del SNC adulto de la rata y mostró la localización preferente en los cuerpos celulares y dendritas proximales (y más en la parte proximal de éstas) de las neuronas. La distribución irregular de los canales de Ca^{++} que median

corrientes de Ca^{++} de larga duración puede servir para incrementar el influjo de Ca^{++} en los orígenes de las dendritas principales. Este calcio tendría una función de segundo mensajero para iniciar sucesos reguladores intracelulares en el cuerpo celular en respuesta a estímulos sinápticos en las dendritas.

La localización predominante postsináptica de los canales sensibles a DHP, o canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L, encontrada en la observación de Ahlijanian confirma estudios previos de Sanna y cols. (1986), que encontraron abolición de sitios ligadores para [3H]nitrendipina en membranas sinaptosomales de núcleo caudado lesionado con ácido kaínico y ningún cambio tras lesiones específicas de terminales axonales dopaminérgicas o serotoninérgicas. Asimismo Cortés y cols. (1984) demuestran que la localización de elevadas densidades de sitios ligadores sensibles a DHP en la capa molecular del gyrus dentato del hipocampo se debe a una asociación de estos lugares con las dendritas de las células granulosas ya que al lesionar esta población celular con colchicina se produjo una deplección de dichos lugares en el gyrus dentato.

En la revisión de Hosey y Lazdunski (1989) se indica que la aparición ontogénica de los canales de Ca^{++} identificados con la fenilalquilamina (-)D888 en el cerebro de mamíferos está íntimamente relacionada con el desarrollo de la arborización dendrítica.

Centros de fijación de w conotoxina.

Kerr y cols. (1988) mediante un estudio autorradiográfico in vitro con [^{125}I]w-conotoxina, encontraron elevadas densidades de lugares ligadores de esta toxina en la mayoría de sustancia gris

del sistema nervioso central con predominio en el estriado, el hipocampo y el cortex frontal. Para comparar realizaron asimismo una autorradiografía utilizando [³H]nitrendipina y llegaron a la conclusión de que la distribución de lugares ligadores de DHP es diferente de los de w-conotoxina.

Utilizando derivados fluorescentes de la w conotoxina, Jones y cols. (1989) observaron concentración de canales de Ca⁺⁺ sensibles a la conotoxina en sitios de contacto sinápticos en terminales axonales en neuronas CA1 hipocampales mientras que en las dendritas su distribución fué puntual e interrumpida por grandes regiones carentes de estos lugares. Ya que se considera que esta toxina es específica para los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N (Rivier y cols.,1987) este estudio favorece la idea de que estos canales predominan en las terminales presinápticas mediando el incremento en el calcio intracelular que desencadena la liberación de neurotransmisores.

En una revisión debida a Ahlijanian y cols. (1990) se recogen reportajes de que los canales N son responsables de la entrada del calcio que inicia la liberación de norepinefrina de neuronas del ganglio simpático y liberación de GABA, acetilcolina, dopamina y serotonina de cortes cerebrales.

Desde luego no se excluye la presencia de una densidad baja de canales L en las terminales nerviosas o de subtipos de canales DHP no reconocidos por las técnicas actuales. Pero parece que el principal papel funcional de los canales de Ca⁺⁺ sensibles a DHP está en la generación de potenciales de acción dependientes de calcio y en la regulación de las acciones del calcio intracelular como segundo mensajero en cuerpos celulares y dendritas mientras que los canales de tipo N intervienen en el influjo de calcio

necesario para iniciar la liberación de neurotransmisores (Hirning y cols.,1988; Herdon y Nahorsky,1989; Lipscombe y cols.,1989; Maggi y cols.,1990; Xiang y cols.,1990).

1.5. FARMACOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO.

(Godfraind,1985; Janis y cols.,1987; Greenberg,1987; Hosey y Lazdunski,1988; Godfraind y Govoni,1989).

1.5.1. Generalidades.

Los antagonistas de canales de calcio son considerados como drogas que interfieren con la función del calcio. Por tanto, cualquier compuesto orgánico que simule la supresión de calcio en cualquier sistema biológico podría pertenecer a este grupo. Este conjunto de drogas ha recibido otros nombres, como bloqueantes de canales de Ca^{++} , antagonistas de Ca^{++} o bloqueantes de la entrada de Ca^{++} .

Cuando se establecen curvas concentración / efecto sobre la base de datos experimentales, el antagonismo ahí observado puede aparecer como competitivo o no competitivo. Esta apariencia fenomenológica del antagonismo no solo depende del tipo de droga usada sino también del tejido examinado. Muchas observaciones muestran similitudes básicas en los mecanismos bioquímicos responsables del manejo del Ca^{++} en varios tejidos e indican que dichos mecanismos están distribuidos irregularmente en aquéllos. Por tanto, un análisis comprensivo de la acción de los antagonistas del calcio requiere que sea hecho en diferentes tejidos.

El concepto de antagonismo del canal de Ca^{++} ha sido desarrollado sobre la base de dos aproximaciones experimentales paralelas y, al mismo tiempo, diferentes. Una utilizando estudios en el músculo liso y la otra con músculo cardíaco. Los primeros antagonistas de calcio fueron sintetizados a finales de los años 50 por compañías farmacéuticas que desconocían completamente el mecanismo de acción de los mismos (Godfraind, 1985). Así, la cinaricina, que fue la primera droga en ser reconocida como antagonista del canal de calcio por Godfraind y Polster en 1968, había sido descrita inicialmente como antihistamínico y de uso para el mareo cinético. El verapamil, por su parte, fue introducido como bloqueante β adrenérgico lo mismo que la prenilamina.

Las drogas que han recibido una mayor atención pertenecen a cuatro clases químicamente diferentes:

- (a) - Derivados 1,4 dihidropiridinas (DHP): nifedipina, nicardipina, nimodipina, nitrendipina etc.;
- (b) - Fenilalquilaminas: verapamil, D-600, D-888;
- (c) - Difenilalquilaminas: cinaricina, flunaricina;
- (d) - Benzodiazepinas: diltiazem.

Otras numerosas drogas también exhiben efectos antagonistas de los canales de calcio, aunque la mayoría son menos potentes y específicos que los agentes clásicos enumerados arriba.

Así: la fenitoina, los antipsicóticos difenilbutilpiperidinas, fenotiazinas y butirofenonas, los antidepresivos tricíclicos, los anestésicos locales, el etanol, los barbitúricos incluyendo fenobarbital y pentobarbital, las benzodiazepinas como el diazepam y el clorazepam, la reserpina, la fenciclidina, la ciproheptadina, el diazóxido, el antagonista β adrenérgico

propranolol, los antidiarreicos loperamida y difenoxilato, el antiestrógeno tamoxifeno y los antineoplásicos antraciclinas, entre otros.

Modificaciones estructurales mínimas pueden convertir a los antagonistas de los canales de Ca^{++} en agonistas. Los agonistas del canal de calcio más estudiados por el momento son los derivados dihidropiridinas Bay K 8644, CGP 28 392 y YC-170. En algunos casos un isómero dihidropiridina es agonista, y el otro es antagonista ya que muchos antagonistas del canal de Ca^{++} tienen efectos estereoselectivos y uno de dos isómeros ópticos es sustancialmente más potente que el otro.

Los antagonistas clásicos del canal de Ca^{++} son generalmente inhibidores más potentes del flujo de Ca^{++} a través de canales dependientes de voltaje que de canales operados por receptor. También más potentes en músculo liso y cardíaco que en músculo esquelético. Además, algunos de ellos, especialmente las dihidropiridinas, afectan preferentemente al músculo liso vascular sobre el intestinal, con la vasculatura coronaria y cerebral particularmente sensible. La mayor parte de las drogas desarrolladas hasta la fecha parecen tener efectos selectivos en el canal L. Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de estudios no han probado sistemáticamente los tipos de drogas existentes en las diferentes clases de canales de Ca^{++} .

Reportajes recientes en la literatura indican que las DHP no son bloqueantes selectivos del canal L sino que también bloquean las corrientes T. También se ha reportado que la flunaricina (compuesto que se ha visto que es un antagonista del canal de calcio por estudios de unión de ligando y de flujo de calcio pero que no ha sido estudiado extensamente desde un punto de vista

electrofisiológico) bloquea ambos canales.

Ha habido controversia considerable sobre los canales de Ca^{++} neuronales y si son sujetos a inhibición por antagonistas del calcio. Varios estudios han reportado efectos débiles o ausentes de los agonistas y antagonistas de los canales de calcio sobre el influjo de Ca^{++} evocado por despolarización y la liberación de neurotransmisores en cortes cerebrales, mientras que otros han encontrado que tales preparaciones así como líneas celulares cultivadas son muy sensibles a estas drogas. La existencia, además, de cambios de conducta en animales que reciben agonistas o antagonistas del canal de Ca^{++} podría apoyar el concepto de que los canales de Ca^{++} neuronales son afectados. Pero la posible afectación neuronal por estos compuestos podría deberse a mecanismos no involucrando inhibición directa del influjo de calcio.

Las discrepancias observadas en la sensibilidad neuronal a las drogas moduladoras del canal de Ca^{++} pueden ser debidas a la heterogeneidad de los canales de calcio. Como se mencionó previamente, se conocen al menos tres clases de canales de Ca^{++} en las neuronas, de los que solo uno es sensible a las drogas. Los canales de Ca^{++} con propiedades diferentes pueden ser localizados en distintas regiones de la neurona y la expresión de las clases de canales puede cambiar a lo largo de la diferenciación neuronal.

Además, el tipo de canal de Ca^{++} que está ligado a la liberación de neurotransmisores parece variar para clases diferentes de neuronas lo que puede explicar el por qué la liberación es resistente a la inhibición por drogas antagonistas del canal de Ca^{++} en algunas estructuras experimentales.

Generalmente se está de acuerdo en que varios factores pueden influenciar significativamente la interacción de efectores del canal de Ca^{++} con sus receptores. Así las interacciones alostéricas entre drogas actuando en los diferentes sitios receptores que son complejas y no están totalmente comprendidas, o la dependencia del voltaje en las acciones y la unión de algunas de estas drogas como los inhibidores del canal de Ca^{++} de la serie DHP que actúan con significativamente mayor afinidad sobre preparaciones despolarizadas comparadas con las polarizadas. Se ha demostrado la conversión de sitios de unión a DHP de alta a baja afinidad en respuesta a diferencias en el potencial de membrana. Tampoco puede ser descartada la posibilidad de que existan subtipos de receptores que medien la activación o inhibición de la actividad del canal.

1.5.2. Propiedades farmacocinéticas.

Se conocen las siguientes características farmacocinéticas de los fármacos utilizados en el presente estudio.

Se absorbe alrededor de un 50% de una dosis administrada oralmente de nifedipina (Greenberg, 1987) mientras que una dosis sublingual es casi completamente absorbida. La mayor parte de la droga está ligada a proteínas en el plasma. Niveles pico en plasma se alcanzan 1-3 horas tras la administración oral. La nifedipina es eliminada por metabolismo hepático a derivados inactivos farmacológicamente con una vida media de 2-4½ horas. Hay variaciones interindividuales en la disposición de la nifedipina lo que se piensa es debido al polimorfismo de los enzimas metabolizadores hepáticos que conducen a diferencias en

el metabolismo de primer paso (Rämsch y cols.,1986).

El verapamil (Greenberg,1987) es absorbido solo en una 1/5 parte cuando se administra oralmente debido al metabolismo de primer paso en el hígado. Sin embargo, la administración repetida incrementa su biodisponibilidad. Aproximadamente el 90% de la droga absorbida está ligada a proteínas del plasma. El comienzo de los efectos clínicos ocurre alrededor de 1-2 horas tras la administración oral y a los 10 min cuando se da ev. Niveles pico en plasma se alcanzan alrededor de las 5 horas. La eliminación se produce con una vida media de 2½ a 7½ horas que se incrementa al repetir las administraciones. El metabolito hepático norverapamil es activo farmacológicamente pero menos que el verapamil. Mediante experimentos con una cánula push-pull para observar la penetración de la droga en el tejido cerebral (Rezvani y cols.,1986) se ha visto que una vez se alcanza el punto de saturación y se establece una captación estable del verapamil, la exposición adicional del tejido a este agente no sirve para alterar la magnitud de su captación.

La cinaricina marcada administrada en ratas por vía oral (Allewijn,1968) muestra una absorción intestinal rápida. Los niveles máximos de radioactividad se alcanzan dentro de la primera hora de su administración en todos los tejidos, a excepción de las gónadas en donde este nivel se alcanzó pasadas 4-8 horas. Se metaboliza en el hígado de un modo rápido. En experimentos dirigidos a comprobar las propiedades anticonvulsivas de este fármaco, el efecto máximo se obtuvo a las 2 horas y media de su administración (Desmedt y cols.,1975).

Tras la administración oral de flunaricina a ratas (Heykants y Michiels,1976) se observa una desaparición rápida del estómago.

Cantidades máximas de la droga en intestino delgado y grueso se encuentran a 1-2 y 4-8 horas respectivamente. Ocho horas después de la dosis, alrededor del 80% de ésta es absorbido por el tracto gastrointestinal. Los niveles plasmáticos y tisulares máximos se encuentran alrededor de las 2 h de la administración exceptuando el tejido adiposo y las gónadas donde se alcanzan a las 24 horas. La fase de distribución dura de 16-24 horas. En experimentos crónicos la fase de absorción es más rápida y la eliminación más lenta en comparación con los experimentos agudos. No se encontró indicación de saturación de los tejidos tras 9 dosis elevadas de flunaricina. La flunaricina se acumula en el tejido adiposo que actúa como depósito a partir del que puede ser redistribuída al plasma y los tejidos (Michiels y cols.,1983). En experimentos dirigidos a comprobar las propiedades anticonvulsivas de este fármaco, el efecto máximo se observó a las 5 h 45 mn de su administración (Desmedt y cols.,1975).

El haloperidol (Lewi y cols.,1970) tiene un curso temporal en el cerebro con cuatro componentes: una captación inicial rápida, niveles máximos que se alcanzan un poco antes de una hora de la administración, un componente rápido de eliminación entre 2 y 4 horas y una eliminación más lenta de la droga más allá de 8 horas.

Su captación por el hígado es más rápida que por el cerebro.

En la sangre los niveles pico se alcanzan antes de un cuarto de hora de la administración. La eliminación rápida se produce entre 1/4 y 1 hora. La sangre es drenada de su contenido en haloperidol en las primeras 2 horas por paso a otros tejidos, y más rápidamente a dosis más bajas, lo que explica por qué las proporciones en el cerebro y el hígado son mayores que en la

sangre en la parte inferior de la escala de dosis. Algún haloperidol puede ser devuelto a la sangre por estos tejidos entre 1 y 4 horas, especialmente a dosis más elevadas.

Hay metabolitos del haloperidol que se incrementan con el tiempo y la dosis. Se mantienen en sangre unidos a las proteínas o a las membranas celulares lo que explica su lentitud de eliminación. La fracción de metabolitos en el cerebro es más pequeña que en la sangre. La similitud en la dependencia del tiempo de los metabolitos en cerebro y sangre va a favor de la hipótesis de que la barrera hematoencefálica en la rata es solo parcialmente eficiente para los metabolitos del haloperidol.

Los compartimentos cerebral y hepático manejan sus respectivos niveles de droga independientemente de los niveles instantáneos en sangre. Los niveles cerebrales pueden exceder diez veces los correspondientes a la sangre. (Tabla 2)

TABLA 2. Características farmacocinéticas.

	Niveles mx. en plasma	Niveles mx. en cerebro	Efecto anticonvulsivo máximo
Nifedipina	1-3 h.	---	---
Verapamil	5 h.	---	---
Cinaricina	1 h.	---	2 ½ h.
Flunaricina	2 h.	---	5 h. 45 mn.
Haloperidol	¼ h.	1 h.	---

1.5.3. Aplicación clínica.

Godfraind y Govoni realizaron una revisión de los resultados obtenidos en estudios clínicos presentados por numerosos

investigadores en el Congreso sobre Antagonistas de Canales de Calcio celebrado en Florencia en el mes de Mayo de 1989. Los puntos destacados por ellos son los siguientes:

Los antagonistas de canales de calcio tienen muchas aplicaciones clínicas potenciales incluyendo la hipertensión arterial y la isquemia cardíaca. Además estas drogas están siendo ensayadas para observar su eficacia en el tratamiento de los accidentes vasculares cerebrales y la migraña.

La eficacia de estos fármacos depende del estado del tejido sobre el que actúan, el cual puede estar alterado a su vez por un proceso patológico.

Hasta la fecha, solo el diltiazem ha dado resultados alentadores en el tratamiento de prevención secundaria tras el infarto de miocardio agudo.

Ensayos clínicos que se están llevando a cabo utilizando los bloqueantes flunaricina y nimodipina en la isquemia cerebral, tanto focal como global, han dado resultados alentadores pero no concluyentes, requiriendo una mayor investigación.

Se ha despertado el interés de estas drogas como potenciales agentes antiarterioescleróticos. Compuestos similares al verapamil y al diltiazem (pero no los similares a la nifedipina o a la flunaricina) inducen catabolismo mediado por receptor de las lipoproteínas de baja densidad por fibroblastos humanos en cultivo. No se conoce la relación de estas propiedades antiaterogénicas con el antagonismo del canal de calcio. En la clínica los antagonistas del Ca^{++} no disminuyen los lípidos sanguíneos pero pueden tener un efecto directo en los procesos involucrados en la formación de la placa de ateroma. Estudios en cultivos celulares indican que los antagonistas de canales de

Ca⁺⁺ son activos en modular la proliferación de células musculares lisas y el metabolismo lipídico celular alterado que son mecanismos principales en la formación de ateromas.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. REACTIVOS. FARMACOS.

En este estudio se han utilizado los siguientes reactivos y fármacos:

Acetato sódico (Merck)

Acido acético (Sigma)

Acido cítrico (Merck)

Acido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Sigma)

Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)

Acido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (Acido homovanílico) (HVA) (Sigma)

Acido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA) (Sigma)

Acido octansulfónico (OSA) (Merck)

Acido perclórico (PCA) (Sigma)

Alúmina (Sigma)

Cinaricina (Esteve)

Cloruro cálcico (Merck)

Cloruro magnésico (Merck)

Cloruro potásico (Merck)

Cloruro sódico (Merck)

Flunaricina (Esteve)

Glucosa (Sigma)

Haloperidol (Sigma)

Hidrato de cloral (Sigma)

L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Sigma)

3-hidroxibenzilhidrazina (NSD-1015) (Sigma)

3-hidroxitiramina (Dopamina) (Sigma)
5-hidroxitriptamina (Serotonina) (Sigma)
3-metoxitiramina (3-MT) (Sigma)
Metanol (Romil)
Noradrenalina (NA) (Sigma)
Nicardipina (Esteve)
Nifedipina (Esteve)
Tritón (Sigma)
Tween-20 (Sigma)
Verapamil (Esteve)

2.2. TECNICAS UTILIZADAS.

2.2.1. Exploración neuroquímica local in vivo en cerebro de animales.

Las investigaciones bioquímicas del cerebro se han llevado a cabo hasta una época reciente analizando el contenido de varias sustancias químicas en el tejido cerebral.

Pero las mediciones tisulares representan una mezcla del contenido intra y extracelular de las mismas, de modo que para obtener una medición relacionada más directamente con la transmisión sináptica es interesante analizar específicamente el contenido del espacio extracelular que constituye aproximadamente el 20% del volumen cerebral total y es el lugar donde existe un extenso tránsito químico entre neuronas, células gliales y vasos sanguíneos. Contiene los distintos neurotransmisores y sus metabolitos así como precursores metabólicos y productos de deshecho que circulan entre los componentes celulares del sistema

nervioso.

Siempre se pensó que una técnica universalmente aplicable para analizar el contenido del líquido extracelular añadiría una nueva dimensión a la fisiología cerebral. Hubo varios intentos hasta que se consiguió desarrollar la técnica de exploración neuroquímica local in vivo en cerebro de animales por excelencia, o diálisis intracerebral, tal como la conocemos hoy.

Evolución de la técnica en el tiempo.

(Philippu,1984; Moroni y Pepeu,1984; Ungerstedt,1984; Marsden y cols.,1984; Benveniste,1989; Benveniste y Hüttemeier,1990; Di Chiara,1990).

Se han hecho diversas pruebas para desarrollar métodos adecuados para la perfusión del medio extracelular desde 1915 en que Hashimoto describió lo que puede considerarse con toda probabilidad el primer sistema de cánula para inyectar soluciones en el cerebro de un animal no narcotizado. La cánula inyectora se insertaba en el cerebro a través de una guía.

En los años treinta la técnica fue avanzada por Hasama, Masserman y otros, cuyo trabajo se malogró por los grandes volúmenes inyectados y su ulterior dispersión lo que impedía cualquier localización anatómica precisa de la acción de la droga en cuestión. Masserman fue el que desarrolló lo que posteriormente se llamó quemitrodo para estimulación eléctrica simultánea a la inyección de un compuesto.

En los años cuarenta Comroe inyectó un volumen no mayor de cinco microlitros en el tronco encefálico de un animal y advirtió sobre las diferencias entre inyección en el tejido cerebral o en

el espacio ventricular.

En 1953, Liljestrand improvisó un segundo quemitrodo al introducir un fino alambre de plata en el interior de un tubo capilar de cristal.

En 1956, von Euler y Holgrem publicaron lo que se considera actualmente el modelo de cánula estándar sobre el que se han basado todas las variaciones existentes. A través de un tubo guía implantado en el cerebro y cementado al orificio de craneotomía, se introducía la cánula.

En 1961, Gaddum publicó el sistema de doble cánula push-pull. Esta técnica supone la perfusión del cerebro utilizando dos cánulas adyacentes, una conectada a una bomba de perfusión (push) mientras la otra es utilizada para extraer (pull) el medio de perfusión.

En 1966 Bito reportó la implantación de un pequeño saco de diálisis relleno con una solución salina en el hemisferio cerebral de un perro. Tras algunas semanas, el saco fue extraído y determinado su contenido en aminoácidos.

En 1970 Delgado explicó lo que habría de ser la descripción básica de dialitrodo. En la punta de una cánula push-pull colateral cementó una bolsa de diálisis miniatura.

En 1982 Ungerstedt utilizó un tubo de diálisis en vez de una bolsa, la fibra hueca, que constituye el sistema de diálisis en la actualidad.

Existen otras técnicas in vivo aparte de la diálisis. Así, el análisis del líquido cefalorraquídeo ventricular que posee el inconveniente de que los cambios encontrados en los metabolitos no pueden ser atribuidos a regiones cerebrales específicas, y la voltametría que permite la monitorización electroquímica de

catecolaminas cerebrales. Supone la aplicación de un potencial a un microelectrodo implantado (diámetro de la punta, 10 a 100 micras) y la medición de moléculas oxidables en la vecindad de la punta del electrodo. El problema es la dificultad de medir niveles basales de dopamina debido a la contaminación por los elevados niveles extracelulares de sus metabolitos ácidos, así como del ácido úrico y del ácido ascórbico.

Principios de diálisis tisular.

(Ungerstedt, 1984; Benveniste, 1989; Benveniste y Hüttemeier, 1990).

La diálisis consiste en la difusión de pequeñas moléculas y agua a través de una membrana semipermeable. La fibra hueca es una membrana porosa en la que el tamaño de las moléculas que pueden pasar a su través queda determinado por el tamaño de los poros. Al perfundir las fibras a pequeña velocidad, las sustancias difundirán a través de la membrana. Si el líquido de perfusión transporta sustancias concentradas, éstas dejarán la luz tubular y pasarán al tejido. Por el contrario, cuando se utiliza una solución fisiológica en la perfusión, idéntica a la del espacio extracelular, varios solutos en su camino entre células y entre células y vasos sanguíneos difundirán al interior de la fibra y serán transportados por el líquido de perfusión.

Este método presenta varios aspectos valorables:

a) La liberación o el metabolismo de una sustancia química, en este caso de la DA, puede ser seguida continuamente en el cerebro con circuitos neuronales reguladores intactos;

b) Es posible estimular eléctrica o químicamente un área cerebral mientras se mide la liberación o el metabolismo de la

DA en otra;

c) Pueden administrarse drogas por via sistémica y comprobar su efecto a nivel cerebral;

d) La liberación y metabolismo de la DA en el cerebro de animales despiertos puede relacionarse directamente con cambios en su conducta.

Ahora bien, hay que considerar un aspecto importante en el uso intracerebral de las fibras de diálisis y es su relación con la barrera hematoencefálica. Es inevitable que la implantación como tal dañe los vasos sanguíneos. En teoría, ésto abrirá la diálisis a los vasos sanguíneos, y las sustancias recuperadas pueden reflejar el contenido en espacio extracelular y sangre. Pero, por otro lado, parece lógico asumir que los vasos sanguíneos lesionados se cerrarán rápidamente por el proceso de coagulación y, por tanto, impedirán la comunicación con el torrente circulatorio. Parece confirmarse este hecho por experimentos realizados con technitato sódico que no pasa la barrera (Ungerstedt,1984). Al inyectarlo endovenosamente durante una diálisis se llegaron a medir 1500 cuentas en 10 microlitros de sangre, mientras que ninguna se detectó en los dializados. En contraste, al inyectar [^3H]H₂O que sí atraviesa la barrera se midieron 2000 cuentas en 10 microlitros de sangre y 1200 cuentas en el mismo volumen de dializado. Esto indica que la fibra de diálisis es funcional dentro de la barrera.

2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica.

El análisis cromatográfico es una técnica que se basa en la

separación de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria, que suele ser un soporte sólido, y una móvil que puede tratarse de un líquido (cromatografía líquida) o de un gas (cromatografía de gases).

En la cromatografía líquida de alta presión o elevada eficacia (HPLC) la fase líquida es bombeada a un flujo escogido previamente, con una presión de 100 a 200 bar a través de una columna donde se encuentra, cerrada herméticamente, la fase estacionaria. El utilizar una presión elevada permite que el tipo de fase estacionaria esté compuesta de partículas de diámetro muy pequeño (2-10 μm) lo que aumenta de forma considerable la superficie de interacción entre la muestra y la fase estacionaria y una mayor eficacia y resolución del sistema. Los tiempos de análisis son cortos (entre 15 y 30 minutos) y la cantidad de muestra inyectada muy pequeña. Un detector conectado a la salida de la columna (en este caso, un detector electroquímico, DE) proporciona un registro continuo del líquido que va eluyendo y permite identificar y cuantificar directamente los componentes de la mezcla.

Las condiciones utilizadas en los diversos experimentos de este estudio, fueron las siguientes:

Tejido estriatal.

En los experimentos de estandarización del método de diálisis intracerebral, muestras de 20 μl , obtenidas del sobrenadante tras el procesamiento del tejido, se analizaron para determinar niveles de dopamina (DA), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT), ácido 5-

hidroxiindolacético (5-HIAA) y noradrenalina (NA). Los compuestos se separaron en una columna de fase reversa Nucleosil 5 C₁₈ y se cuantificaron utilizando una curva de estándares externos con un detector electroquímico (Bioanalytical Systems modelo LC-4B a un potencial de 0.5 V para catecoles y 0.75 V para metabolitos de monoaminas e indoles). La fase móvil consistió en 0.1 M citrato/fosfato (pH 6.5) para catecoles y pH 3.5 más 8% de metanol para metabolitos de monoaminas e indoles (Mena y cols.,1984).

En el resto de los experimentos, muestras de 20 µl se analizaron para determinar DA, DOPAC, HVA y 3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por medio de una columna de fase reversa µBondapack C₁₈ y fueron cuantificados utilizando una curva de estándares externos con un detector electroquímico (Bioanalytical Systems LC-4B; potencial 0.7 V) a un flujo de 1 ml/min. La fase móvil consistió en acetato sódico 30 mM, ácido cítrico monohidratado 20 mM, ácido 1 octanosulfónico 2 mM y 7% de metanol con un pH final de 4.03.

Diálisis intracerebral.

En los experimentos de puesta a punto del método, muestras de 20 µl obtenidas de la diálisis intracerebral, se analizaron para determinar su contenido en 3-MT, DOPAC, HVA y 5-HIAA, utilizando una columna de fase reversa Nucleosil 5 C₁₈ y se cuantificaron mediante una curva de estándares externos utilizando un detector electroquímico (Bioanalytical Systems modelo LC-4B a un potencial de 0.75 V). La fase móvil consistió en 0.1 M citrato/fosfato pH 3.5 más 8% de metanol (Mena y cols.,1984).

En el resto de experimentos, muestras de 50 µl fueron

inyectadas en un cromatógrafo HPLC/ED por medio de un inyector BAS y una bomba Waters 510. La DA y sus metabolitos se separaron en una columna de fase reversa Nucleosil C₁₈ (partículas de 10 µm) y se cuantificaron contra una curva de estándares externos utilizando un detector electroquímico Waters 460 (potencial 0.74 V). La fase móvil consistió en acetato sódico 27 mM, ácido cítrico monohidratado 27 mM, ácido 1 octanosulfónico 0.5 mM, EDTA 2 H₂O 0.1 mM y 12% de metanol a un pH de 3.80.

2.2.3. Actividad del enzima tirosina hidroxilasa.

En un grupo de animales se estudió la actividad del enzima tirosina hidroxilasa (TH) en estriado, tras la administración aguda o crónica de dosis elevadas de flunaricina o cinaricina, al observar la velocidad de síntesis de la DA, midiendo el acúmulo de L-DOPA en tejido estriatal al inhibir el enzima L-aminoácido decarboxilasa por medio de la 3 hidroxibenzilhidrazina (NSD). El NSD se administró por vía intraperitoneal 15 minutos antes de la decapitación del animal.

2.3. ANIMALES.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de un peso entre 190 y 220 gramos. Los animales se mantuvieron en un ciclo estándar de luz y oscuridad y se les permitió acceso libre a comida y agua.

2.4. ANESTESIA.

Las ratas utilizadas en el experimento de estandarización de la técnica de diálisis fueron anestesiadas con tiopental[®] (42 mg/kg/ip). En los animales del resto de los experimentos la anestesia se efectuó con hidrato de cloral (440 mg/kg/ip).

2.5. IMPLANTACION ESTEREOTAXICA.

En los experimentos de estandarización de la técnica de diálisis las cánulas utilizadas fueron construídas según el procedimiento de Lerma y cols.(1986). Las ratas anestesiadas se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf 1404) y se les implantó una fibra de diálisis en el núcleo estriado izquierdo (coordenadas 0.2, 3 y 5 en relación a bregma) según el atlas de König y Klippel (1963). La fibra se protegió con un tubo de plástico y se cementó al cráneo. La piel fué suturada y se permitió la recuperación de los animales.

En el resto de experimentos de diálisis las guías y las fibras de diálisis se obtuvieron de Carnegie Medicin, Stockholm, Suecia. Estas fibras tienen una longitud de diálisis de 4 mm. y un diámetro interno de 400 micras. El grosor de la pared es de 60 micras y dejan pasar moléculas de un peso molecular de hasta 20000 Daltons.

Las ratas anestesiadas se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf 1404). Las fibras se implantaron en el núcleo estriado derecho (coordenadas 1.2 y 2.6 con respecto a bregma, según König y Klippel) a través de una guía previamente

cementada a la calota del animal. La piel fue suturada y se permitió la recuperación de los animales.

2.6. PROCEDIMIENTO DE DIALISIS INTRACEREBRAL.

En los experimentos de estandarización del método se dejó pasar, al menos, un tiempo de 24 horas para evitar posibles artefactos inducidos por la anestesia (Clemens y Phebus, 1983) o por la implantación. Luego los animales fueron conectados a una bomba de perfusión de Harvard y dializados con una solución de Ringer (Na^+ 147 mM, K^+ 4 mM, Ca^{++} 3 mM y Cl^- 157 mM, pH 6.00) a una velocidad de 3.28 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las muestras se recogieron cada 20 min y se congelaron inmediatamente. Las ratas estuvieron moviéndose libremente durante la perfusión.

En el resto de los experimentos, a las 48 horas de la intervención los animales fueron conectados a una bomba de infusión (CMA/100 Carnegie Medicin, Stockholm, Suecia) y perfundidos con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial (ClNa 126.5 mM, ClK 2.4 mM, Cl_2Ca 1.1 mM, Cl_2Mg 0.83 mM, CO_3HNa 27.5 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.5 mM, SO_4Na_2 0.5 mM, glucosa 5.8 mM, pH 7.4) a una velocidad de 2 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. Las muestras se recogieron cada 20 min. en mini Eppendorfs enfriados con hielo, conteniendo 10 μl de PCA 0.1 M para evitar la oxidación de las monoaminas, y se congelaron inmediatamente a -30°C .

Las ratas se mantuvieron despiertas y moviéndose libremente durante la perfusión.

2.7. TRATAMIENTOS

En una primera etapa se administraron dosis elevadas de los fármacos en estudio: flunaricina, 250 mg/kg, cinaricina, 700 mg/kg, verapamil, 50 mg/kg, nicardipina y nifedipina, 225 mg/kg y 350 mg/kg en administración aguda y 45 mg/kg y 70 mg/kg en administración crónica respectivamente. Los vehículos utilizados fueron aceite de oliva, suero fisiológico + 1% tween 20, suero fisiológico y suero fisiológico + 1% tritón (las dos dihidropiridinas), respectivamente. El NSD fué disuelto en suero fisiológico y administrado a una dosis de 100 mg/kg/ip.

En el resto de los experimentos las dosis utilizadas fueron: flunaricina, 30 mg/kg, cinaricina, 68 mg/kg, verapamil, 16 mg/kg, nifedipina y nicardipina, 15 mg/kg y haloperidol, 1 mg/kg. El haloperidol se disolvió en suero fisiológico + 1% ácido acético. El resto de los vehículos utilizados no varió con respecto al caso precedente con el fin de realizar el mismo tipo de tratamiento que en la primera etapa de este trabajo.

El haloperidol fué preparado diariamente y los demás fármacos cada cuatro días. Todos se mantuvieron en frascos protegidos de la luz y se administraron mientras estaban siendo agitados para lograr una suspensión homogénea.

El tratamiento se realizó mediante intubación intragástrica con un volúmen máximo de 1 ml. En el caso de administraciones repetidas se efectuó una cada 24 horas y siempre en el mismo espacio horario.

2.8. DISEÑO DE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS.

2.8.1. Estandarización del método de microdiálisis intracerebral.

Los animales se repartieron en dos grupos experimentales. En el primer grupo, las ratas fueron dializadas durante siete horas consecutivas (9.00-16.00 h) para comprobar la estabilidad de los niveles de los metabolitos de la DA y de la 5-HT a lo largo de la perfusión continuada. La diálisis se comenzó a las 24 h de la implantación.

En el segundo grupo, las ratas fueron utilizadas para estudiar la correlación entre los niveles en dializados y los niveles en tejido de los metabolitos de la DA y de la 5-HT obtenidos a intervalos de 24 h, 4 días y 7 días, respectivamente, después de la implantación de la cánula, así como el efecto producido en el metabolismo de las monoaminas por la implantación de una fibra en el núcleo estriado izquierdo. Los núcleos estriados derechos no fueron implantados y por tanto se utilizaron como control.

Estas ratas fueron dializadas durante dos horas. Después de la decapitación se procedió a la disección por separado de los estriados implantados y no implantados que fueron congelados y almacenados a -80° C hasta su procesamiento y análisis.

2.8.2. Estudio de la función dopaminérgica en tejido estriatal y límbico tras administración de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio. Efecto sobre la tirosina hidroxilasa.

En experimentos agudos se administró una dosis única seguida por decapitación del animal a las 24 horas en el caso de la nicardipina y la nifedipina y en el momento del máximo efecto anticonvulsivo de la droga (5 horas y 2.5 horas, respectivamente) en el caso de la flunaricina y la cinaricina. En los experimentos crónicos, los animales recibieron diez dosis (1/día) de los diferentes compuestos y fueron decapitados a las 24 horas de la última dosis. Hubo siempre un grupo control de animales al que se administró el vehículo utilizado en la disolución de las drogas.

Tras la decapitación los cerebros fueron extraídos y se procedió a la disección de ambos núcleos accumbens y bulbos olfatorios (tejido límbico) y ambos estriados (tejido estriatal) que se mantuvieron congelados a -30° C hasta su análisis.

En un grupo de animales se estudió la actividad estriatal del enzima tirosina hidroxilasa (TH) tras la administración aguda y crónica de flunaricina o cinaricina.

En este grupo de experimentos, los diferentes compuestos a estudiar fueron administrados a dosis elevadas según la DL_{50} , que en ratas y en administración oral es la siguiente para cada fármaco:

Cinaricina >1000
Flunaricina 312
Nifedipina 1022 (en mg/kg)
Nicardipina 634
Verapamil 114

2.8.3. Estudio de la función dopaminérgica en tejido estriatal y límbico tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio.

Los animales recibieron 18 dosis orales (1/día) de cada uno de los compuestos investigados, siempre en el mismo espacio horario. Hubo un grupo control para cada vehículo utilizado.

A las 24 h de la última dosis, las ratas fueron decapitadas, sus cerebros extraídos y se procedió a la disección de ambos núcleos accumbens y bulbos olfatorios (tejido límbico) y ambos estriados (tejido estriatal) que se mantuvieron congelados a -30° C hasta su análisis.

2.8.4. Estudio de los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos en estriado después de una única administración de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio.

Las ratas se reunieron en 11 grupos experimentales. Seis para cada uno de los distintos fármacos y cinco para los controles respectivos.

Se recogieron muestras de diálisis cerebral basal en cada

animal durante 1 h. A continuación se administró oralmente la droga o vehículo correspondiente por intubación intragástrica y se continuó la recogida de dializados hasta una hora después de haber alcanzado el tiempo del efecto máximo de la droga.

Al terminar la diálisis, los animales fueron decapitados, sus cerebros extraídos, conservados en formol y posteriormente congelados con el fin de visualizar el tracto dejado por la fibra en cortes cerebrales realizados con un microtomo de congelación.

2.8.5. Estudio de los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos en estriado después de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio.

Las ratas se reunieron en 11 grupos experimentales. Seis para cada uno de los distintos fármacos y cinco para los controles respectivos. Se les administraron 18 dosis orales (1/día). En el día diecisiete de tratamiento, las ratas recibieron la dosis correspondiente y posteriormente fueron anestesiadas, colocadas en un aparato estereotáxico e implantadas con una fibra de diálisis. A las veinticuatro horas de la intervención quirúrgica se les administró la última dosis del fármaco, correspondiente al día dieciocho de tratamiento.

A las 48 horas de la implantación y 24 horas de finalizado el tratamiento o la administración de vehículo, se procedió a la diálisis intracerebral según el procedimiento ya explicado anteriormente.

Se descartaron los primeros dializados para evitar posibles interferencias al comenzar a circular el líquido de perfusión y,

posteriormente, se recogieron muestras durante 1h 20 min en cada animal.

2.8.6. Estudio del efecto producido por la despolarización con potasio o por el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos sobre los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos en estriado tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio.

En el mismo grupo de animales del apartado precedente, una vez recogidos los primeros dializados se procedió a la administración intracerebral, a través de la cánula y disuelto en el líquido de perfusión, de cloruro potásico (50 mM) durante 1 hora, habiendo comprobado exactamente el pH de la solución.

A continuación, se sustituyó este líquido de perfusión por otro consistente únicamente en LCR artificial, comprobando otra vez el pH, y se obtuvieron dializados durante 1 hora más antes de la administración intraperitoneal de haloperidol (1 mg/kg), recogiendo muestras durante otras tres horas y considerando finalizada la diálisis.

Las ratas fueron decapitadas, sus cerebros extraídos y congelados con el fin de verificar la situación de la fibra de diálisis.

2.9. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

2.9.1. Por disección tisular.

Las ratas fueron decapitadas y sus cerebros extraídos. Se procedió a la disección de ambos núcleos accumbens y bulbos

olfatorios (tejido límbico) y ambos estriados (tejido estriatal) sobre una placa de Petri mantenida en hielo. Los tejidos se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Posteriormente fueron homogeneizados en ácido perclórico 0.1 M, seguido por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a 4°C . Del sobrenadante se inyectaron los volúmenes correspondientes en el cromatógrafo. Se utilizó el procedimiento de Anton y Sayre (1962) para la extracción de la L-DOPA con alúmina.

2.9.2. Por microdiálisis cerebral.

Las muestras de diálisis no necesitan ningún tipo de procesamiento ya que al utilizar una membrana que actúa como filtro las moléculas de gran tamaño no la pueden atravesar por lo que pueden ser inyectadas directamente en el HPLC.

2.10. ANALISIS ESTADISTICO.

En los experimentos de estandarización de la técnica de microdiálisis el significado de las diferencias en cada grupo se verificó usando los tests de la t de Student y de Dunnett.

Los datos obtenidos en los tratamientos con dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio, fueron examinados utilizando el test de comparaciones múltiples de Dunnett en el caso de los niveles de DA y sus metabolitos y un análisis de la varianza de dos vías con dos factores (droga y NSD) en el estudio de la actividad TH.

En el resto de estudios se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una U de Mann-Whitney.

El análisis realizado en cada caso es especificado en los

piés de las gráficas correspondientes.

3. RESULTADOS.

3.1. ESTANDARIZACION DEL MODELO EXPERIMENTAL DE MICRODIALISIS CEREBRAL EN RATAS.

El desarrollo de las cánulas de perfusión implantables de las que la fibra de diálisis es la versión más moderna y perfecta, permite la medida de niveles de neurotransmisores y sus metabolitos en regiones cerebrales de ratas en libre movimiento. La técnica de diálisis se ha utilizado para el estudio de dopamina y sus metabolitos (Zetterström y cols.,1983; Imperato y Di Chiara,1985; Westerink y Tuinte,1986), aminoácidos (Delgado y cols.,1984; Lerma y cols.,1986) y purinas (Zetterström y cols.,1982; Ballarin y cols.,1987) en el líquido extracelular cerebral.

Cuando se comenzó este trabajo, no había estudios en la literatura sobre los efectos de la implantación del tubo de diálisis y de la perfusión del cerebro sobre el metabolismo de los neurotransmisores. Además muchas de las investigaciones disponibles no evaluaban el perfil temporal de la eficacia del tubo de diálisis es decir, la correlación entre los niveles de neurotransmisores en los dializados y en el tejido.

De modo que en un principio se procedió a la estandarización del método con el fin de buscar las condiciones idóneas de diálisis. Para ello se realizaron experimentos en que se comparan los cambios en los niveles de los metabolitos de la dopamina, 3-MT, DOPAC, y HVA y del metabolito de la 5-HT, el 5-HIAA en dializados y tejido a intervalos de 1, 4 y 7 días después de la

implantación de la cánula. Se investigaron también los cambios en los niveles de los metabolitos de monoaminas como función de la duración de la perfusión así como la repercusión de la implantación y de la perfusión en el metabolismo de diversos neurotransmisores.

3.1.1. Evolución de los niveles basales de dopamina y sus metabolitos en líquido de perfusión estriatal obtenido tras varias horas continuadas de la misma.

A las 24 horas de la implantación de la cánula, un grupo de ratas fue perfundido durante 7 horas consecutivas. En las primeras 4 horas de diálisis los niveles de los metabolitos se mantuvieron estables, pero durante las últimas tres horas, los niveles mostraron una tendencia a disminuir. Al final del período de perfusión, los niveles de 3-MT, DOPAC, HVA y 5-HIAA fueron 85, 70, 67 y 85% de la línea basal, respectivamente. (Fig. 7)

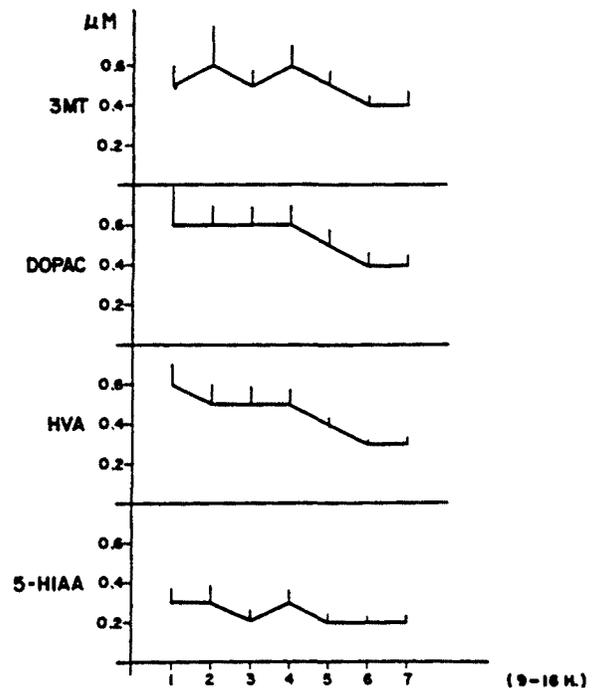


Fig. 7. Perfil de metabolitos de monoaminas obtenidos durante 7 horas consecutivas de diálisis estriatal. Las ratas fueron perfundidas 24 h después de la implantación de la cánula. Los datos son: media \pm SEM de valores de tres animales.

3.1.2. Repercusión de la implantación y perfusión sobre el contenido de aminos y metabolitos en tejido estriatal.

Se observó un incremento significativo de 3-MT, DOPAC y HVA en el estriado implantado comparado con el no implantado (control) 24 horas después de la intervención. Siete días después de la cirugía los niveles de dopamina en el estriado implantado estuvieron disminuidos significativamente con respecto al lado no implantado. (Tabla 3). Los niveles de 5-HIAA permanecieron incrementados, mientras que los de 5-HT se mantuvieron descendidos con respecto al control.

Los niveles de dopamina y sus metabolitos en el tejido implantado de animales decapitados 24 h después de la cirugía fueron significativamente mayores que los encontrados en animales muertos 4 y 7 días después de la implantación. (Tabla 3)

3.1.3. Funcionalismo de la fibra de microdiálisis a lo largo de varios días de perfusión.

Los niveles de los metabolitos de dopamina en los dializados siguieron un perfil temporal similar al del estriado implantado, es decir, una reducción progresiva después del primer día postimplantación.

Pero mientras los niveles de los metabolitos dopaminérgicos en el tejido tendieron a estabilizarse después del cuarto día postimplantación, en los dializados continuaron disminuyendo. (Tabla 3)

TABLA 3. Niveles de monoaminas y sus metabolitos en tejido (control e implantado) y en dializados en los días 1, 4 y 7 después de la implantación de una cámla.

	Estriado Control µg/gr.	Estriado Implant. µg/gr.	Dializados µM	Día post- implantación
DA	4.24 ± 0.42	5.56 ± 0.44		1
	3.42 ± 0.16	2.24 ± 0.61##		4
	3.63 ± 0.13	1.77 ± 0.30***##		7
3-MT	0.38 ± 0.02	0.74 ± 0.06***	0.35 ± 0.04	1
	0.36 ± 0.03	0.40 ± 0.02###	0.16 ± 0.04 ##	4
	0.41 ± 0.02	0.50 ± 0.04##	0.06 ± 0.007###	7
DOPAC	0.32 ± 0.01	0.46 ± 0.04**	0.32 ± 0.03	1
	0.30 ± 0.02	0.18 ± 0.02*###	0.23 ± 0.03#	4
	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.02###	0.13 ± 0.03###	7
HVA	0.28 ± 0.02	0.44 ± 0.01***	0.28 ± 0.03	1
	0.25 ± 0.05	0.22 ± 0.02###	0.19 ± 0.03#	4
	0.20 ± 0.04	0.29 ± 0.05##	0.16 ± 0.03#	7
5-HT	0.57 ± 0.02	0.51 ± 0.04		1
	0.71 ± 0.04	0.46 ± 0.05**		4
	0.77 ± 0.01	0.41 ± 0.04***		7
5-HIAA	0.26 ± 0.02	0.38 ± 0.03**	0.31 ± 0.03	1
	0.33 ± 0.05	0.64 ± 0.03**##	0.36 ± 0.08	4
	0.28 ± 0.02	0.48 ± 0.07*	0.12 ± 0.03#	7

Los valores son medias ± de 5, 6 and 4 animales respectivamente. Las diferencias expresan:

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001 con respecto al estriado control

! p < 0.05

!! p < 0.01

!!! p < 0.001 con respecto al día uno tras la implantación.

3.2. ESTUDIO DEL FUNCIONALISMO DOPAMINERGICO TRAS LA ADMINISTRACION DE FARMACOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO.

Cuando se comenzó este estudio, en la literatura científica no había trabajos sobre el posible efecto producido por la administración de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre el funcionalismo dopaminérgico en cerebro de animales. De modo que se decidió iniciar el estudio evaluando los posibles cambios en los niveles de DA y sus metabolitos en tejido estriatal y límbico de ratas así como la actividad estriatal del enzima tirosina hidroxilasa (TH), limitante en la síntesis de catecolaminas, utilizando dosis elevadas de cada fármaco.

Al observar la existencia de un efecto se decidió continuar el estudio pero a dosis medias, con el fin de evitar un mecanismo de toxicidad como causante del mismo por un lado, y acercarse más a las dosis terapéuticas por otro, teniendo en cuenta que las ratas son animales con un metabolismo muy acelerado (Clow y cols.,1980).

Se alargó a 18 días la administración repetida para aproximarse más a un tratamiento crónico, asumiendo, como Boyson y cols. (1988) que dos semanas de administración de drogas en la rata, especie con un intervalo de vida de 24 meses, son en cierto modo equiparables a meses de administración en humanos, especie con un intervalo de vida de 70 años. Se estudió además el efecto del haloperidol, ya clásico en la investigación dopaminérgica, para comparar su comportamiento en las mismas condiciones que el resto de compuestos evaluados ya que los primeros cambios encontrados orientaban a un efecto similar al de los

neurolepticos.

3.2.1. ESTUDIOS EN TEJIDO ESTRIATAL Y LIMBICO DE RATA.

3.2.1.1. Efecto de la administración de una dosis elevada de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos y sobre la actividad de la tirosina hidroxilasa.

Los niveles de DA no resultaron modificados en ninguno de los casos.

En cuanto a los niveles estriatales de DOPAC y HVA se incrementaron significativamente con respecto al control tras una única dosis de flunaricina. No se observaron cambios significativos en los metabolitos dopaminérgicos después de una dosis de los otros antagonistas de canales de calcio. (Tabla 4)

En un grupo de animales se estudió la velocidad de síntesis de la dopamina a nivel del estriado reflejada en el acúmulo de L-DOPA en 15 minutos tras la administración de NSD después del tratamiento agudo con flunaricina o cinaricina. Una dosis única de flunaricina incrementó significativamente la formación de L-DOPA con respecto al control. No se encontraron cambios en la actividad TH tras una dosis única de cinaricina. (Tabla 7)

3.2.1.2. Efecto de la administración crónica de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos y sobre la actividad de la tirosina hidroxilasa.

Los niveles de DA no se encontraron afectados con excepción de un incremento significativo en estriado en el caso de la cinaricina.

En los tejidos estriatales y límbicos de ratas tratadas con diez dosis de flunaricina (1/día) los niveles de DOPAC quedaron disminuídos significativamente con respecto al control. Lo mismo se observó tras un tratamiento continuado con cinaricina. No se encontraron cambios significativos en el metabolismo dopaminérgico tras la administración repetida de los otros antagonistas de canales de calcio. (Tablas 5 y 6)

No se encontraron cambios en la actividad estriatal de la TH tras diez dosis de flunaricina o cinaricina. (Tabla 8)

TABLA 4. Efecto de una única dosis elevada de los antagonistas de canales de calcio sobre la DA y sus metabolitos en tejido estriatal de rata.

	DA	DOPAC	HVA
Control n=19	9336±542	1484±160	748±41
Cinaricina n=4	10446±432	1869±60	836±74
Flunaricina n=5	8269±430	3423±223***	2343±234***
Nifedipina n=5	8753±614	1243±114	651±64
Nicardipina n=6	8186±732	1269±182	994±47

Estadística realizada con un test de Dunnet. ***<0.001

Los datos se expresan como media ± SEM ,n=nº de animales, en ng/g de tejido.

Los animales fueron tratados por vía oral. En el caso de la cinaricina y la flunaricina se administró una dosis dos horas y media y cinco horas respectivamente antes de la decapitación del animal. En el caso de los otros preparados se administró una dosis 24 horas antes.

TABLA 5. Efecto de la administración crónica de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre la DA y sus metabolitos en tejido estriatal de rata.

	DA	DOPAC	HVA
Control n=25	9617±401	1672±106	868±74
Cinaricina n=10	12214±597**	1109±74**	947±129
Flunaricina n=6	8589±248	1199±37*	711±110
Nifedipina n=9	9611±269	1874±140	859±69
Nicardipina n=10	8544±353	1664±61	828±28
Verapamil n=9	8482±523	1626±55	740±52

Estadística realizada con un test de Dunnet. * <0.05 ; ** <0.01 .

Los datos se expresan como media \pm SEM, n=nº de animales, en ng/g de tejido.

Se administraron diez dosis orales (1/día) de cada fármaco, decapitando al animal a las 24 horas de la última dosis.

TABLA 6. Efecto de la administración crónica de dosis elevadas de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre la DA y sus metabolitos en tejido límbico de rata.

	DA	DOPAC
Control n=25	3115±147	497±23
Cinaricina n=10	3010±136	378±17*
Flunaricina n=7	3117±166	398±37*
Nifedipina n=9	3559±383	545±50
Nicardipina n=10	3317±142	611±42
Verapamil n=9	3157±373	456±64

Estadística realizada con un test de Dunnet. * <0.05 .

Los datos se expresan como media \pm SEM, n=nº de animales, en ng/g de tejido.

Se administraron diez dosis orales (1/día) de cada fármaco y se decapitó a los animales 24 horas después de la última dosis. Los niveles de HVA no se obtuvieron por problemas técnicos.

TABLA 7. Actividad del enzima tirosina hidroxilasa en tejido estriatal de rata tras una única dosis elevada de cinaricina o flunaricina.

Control	Cinaricina
1260±94 (4)	1961±40 (3)
Control	Flunaricina
2339±183 (5)	4454±510 (4) (p=0.052)*

Los datos se expresan como media ± SEM, n=n° de animales, en ng de L-DOPA/g de tejido. Se estudió el efecto de una dosis oral elevada de flunaricina o cinaricina en la velocidad de síntesis de la dopamina a nivel del estriado de rata reflejada en el acúmulo de L-DOPA tras la administración del inhibidor de la L-aminoácido decarboxilasa, NSD. Se administró una dosis elevada de cinaricina o flunaricina y los animales fueron decapitados a las 2 horas y media y 5 horas respectivamente. Quince minutos antes de la decapitación se inyectó el NSD. La comparación de las medias se efectuó mediante un ANOVA con dos factores (Fármaco y NSD). *≤0.05

TABLA 8. Actividad del enzima tirosina hidroxilasa en tejido estriatal de rata tras la administración crónica de dosis elevadas de cinaricina o flunaricina.

Control	Cinaricina
539±67 (5)	527±61 (5)
Control	Flunaricina
450±54 (5)	589±141 (5)

Los datos se expresan como media \pm SEM, n=nº de animales, en ng de L-DOPA/g de tejido. Se estudió el efecto de diez dosis orales (1/día) elevadas de flunaricina o cinaricina en la velocidad de síntesis de la dopamina a nivel del estriado de rata reflejada en el acúmulo de L-DOPA tras la administración del inhibidor de la L-aminoácido decarboxilasa, NSD. Los animales fueron decapitados a las 24 horas de la última dosis. Quince minutos antes de la decapitación se inyectó el NSD. La comparación de las medias se efectuó mediante un ANOVA con dos factores (Fármaco y NSD).

3.2.1.3. Efecto de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de dopamina y sus metabolitos.

Butirofenonas.

No se observó ningún cambio en los niveles de DA, al cabo de 18 días de administración de haloperidol. (Figs. 8 y 9, A)

En cambio dió lugar a una disminución significativa en los niveles de DOPAC y de HVA tanto en tejido estriatal como límbico. El efecto fue similar en ambos tejidos pero algo más marcado para el HVA. (Figs. 8 y 9, B y C)

Difenilalquilaminas.

Ni la cinaricina ni la flunaricina dieron lugar a cambios en los niveles de DA estriatal. Se observó un descenso (23%) en tejido límbico que no resultó significativo. (Figs. 8 y 9, A)

Con respecto a los metabolitos dopaminérgicos, la cinaricina produjo un patrón similar al del haloperidol. Así, dió lugar, al cabo de días de tratamiento, a un descenso en los niveles de DOPAC (en tejido límbico) y HVA (en ambos tejidos) que resultó significativo en el caso del HVA. (Figs. 8 y 9, B y C)

La flunaricina por su parte originó un pequeño incremento en los niveles de DOPAC y HVA que fué mayor para el DOPAC. (Figs. 8 y 9, B y C)

Fenilalquilaminas.

Con el verapamil se encontraron efectos similares a los de las difenilalquilaminas en los niveles de DA. (Figs. 8 y 9, A)

Al cabo de 18 días de tratamiento el verapamil no provocó cambios en los niveles de ambos metabolitos ni en tejido estriatal ni límbico. (Figs. 8 y 9, B y C)

1,4 dihidropiridinas.

La nicardipina mostró un incremento en los niveles de DA estriatales (18%) y un descenso en tejido límbico (19%) que no resultó significativa. (Figs. 8 y 9, A)

La nifedipina no produjo cambios en la DA estriatal pero en cambio disminuyó significativamente los niveles de dopamina en tejido límbico. (Figs. 8 y 9, A)

La nicardipina produjo un incremento en los niveles de DOPAC y HVA en estriado, que se acercó a la significatividad ($p \approx 0.17$), y de HVA en tejido límbico, no significativo. (Figs. 8 y 9, B y C)

Por su parte, la nifedipina no dió lugar a cambios en los niveles de los metabolitos dopaminérgicos en estriado. Se observó una tendencia al descenso de ambos en tejido límbico. No se encontró significación. (Figs. 8 y 9, B y C)

Fig. 8. Efecto del tratamiento crónico con haloperidol o con dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de DA y sus metabolitos en tejido estriatal de rata. Los animales recibieron 18 dosis orales (1/día) de cada fármaco o del vehículo correspondiente y fueron decapitados a las 24 horas de finalizado el tratamiento.

Los datos se expresan como \bar{x} (media \pm SEM, n=nº de animales) de los valores de los animales tratados con vehículo. Cada grupo de ratas se comparó con su propio grupo control, estableciéndose dicha comparación utilizando los porcentajes correspondientes. El número de animales por grupo fué: VER 9, NIC 8, NIF 9, FLU 7, CIN 8 y HAL 9. Se utilizó una U de Mann-Whitney.

A: niveles de DA. Los valores encontrados en los animales control fueron 5329.34 \pm 162.70 ng/g de tejido (n=23).

B: niveles de DOPAC. Los valores encontrados en los animales control fueron 1490.45 \pm 57.11 ng/g de tejido (n=23). **p \leq 0.01.

C: niveles de HVA. Los valores encontrados en los animales control fueron 468.28 \pm 30.04 ng/g de tejido (n=23). **p \leq 0.01.

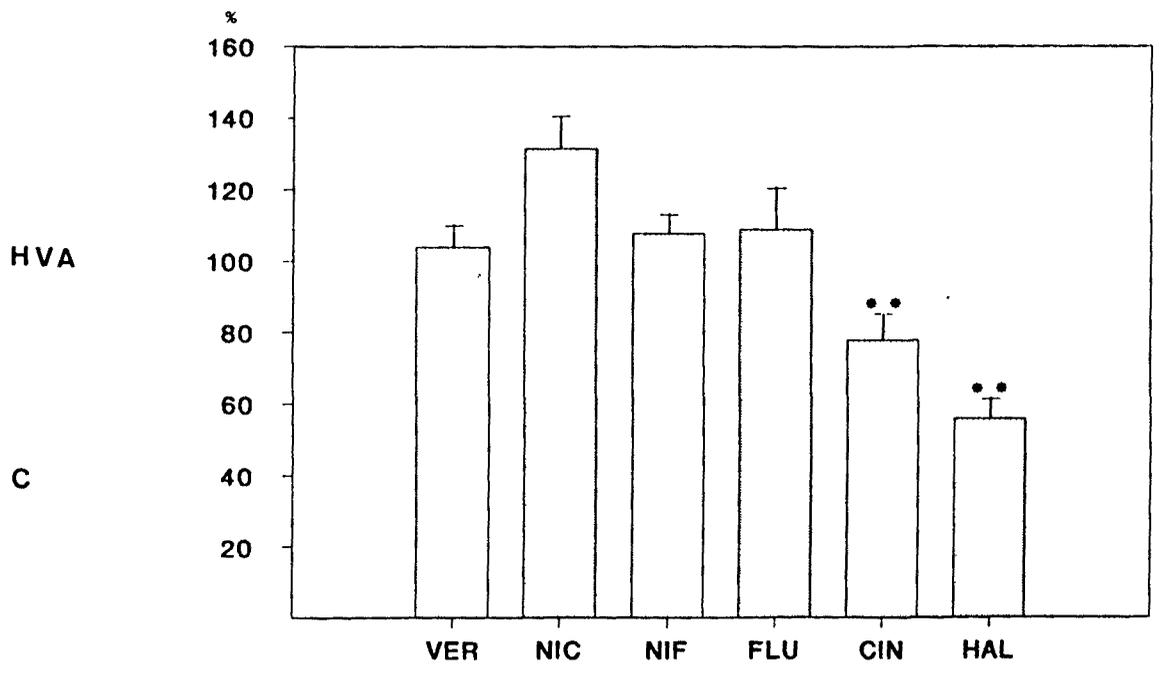
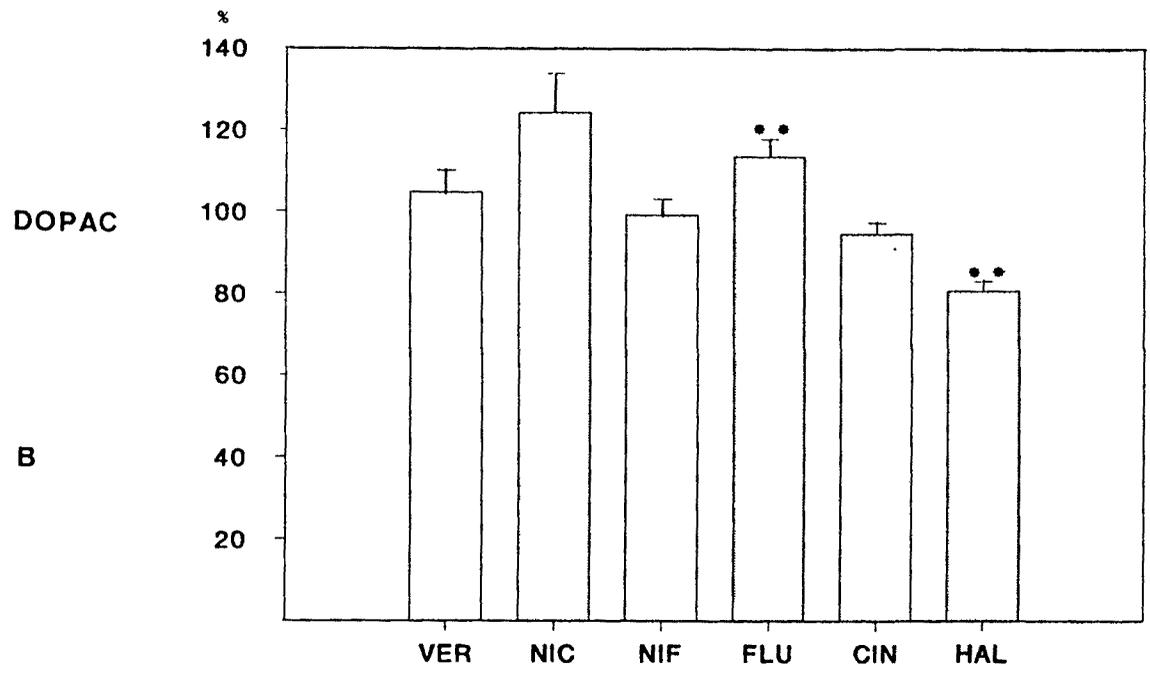
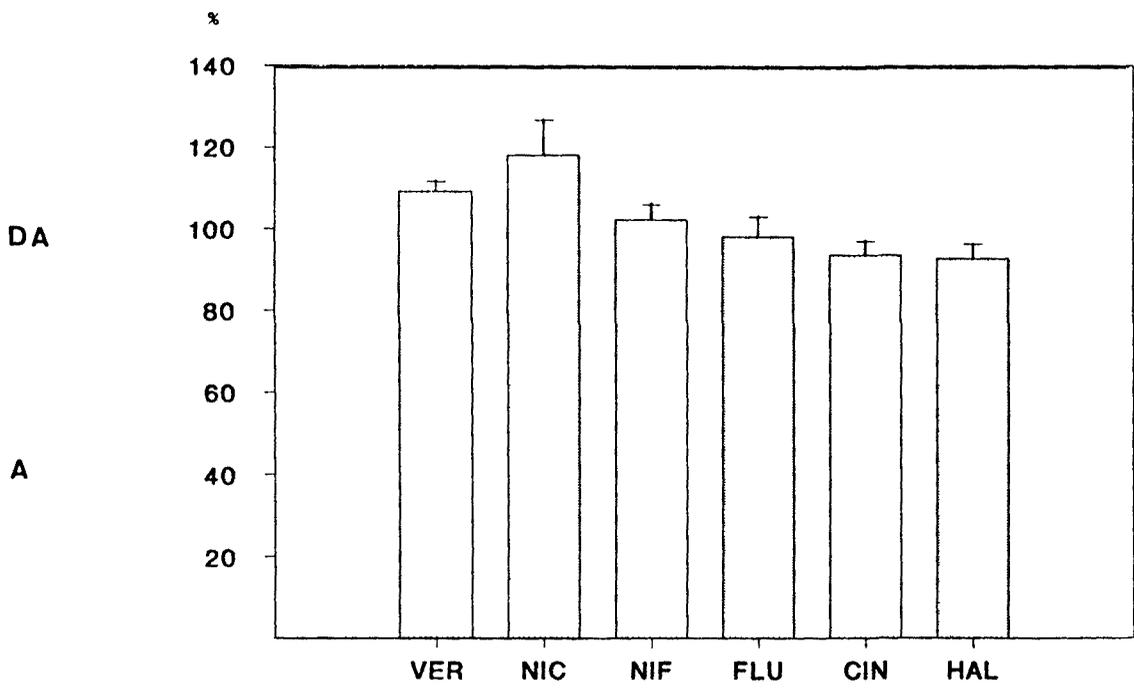


Fig. 9. Efecto del tratamiento crónico con haloperidol o con dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de DA y sus metabolitos en tejido límbico de rata. Los animales recibieron 18 dosis orales (1/día) de cada fármaco o del vehículo correspondiente y fueron decapitados a las 24 horas de finalizado el tratamiento.

Los datos se expresan como % (media±SEM, n=n° de animales) de los valores de los animales tratados con vehículo. Cada grupo de ratas se comparó con su propio grupo control, estableciéndose dicha comparación utilizando los porcentajes correspondientes. El número de animales por grupo fue: VER 9, NIC 8, NIF 9, FLU 7, CIN 8 y HAL 9. Se utilizó una U de Mann-Whitney.

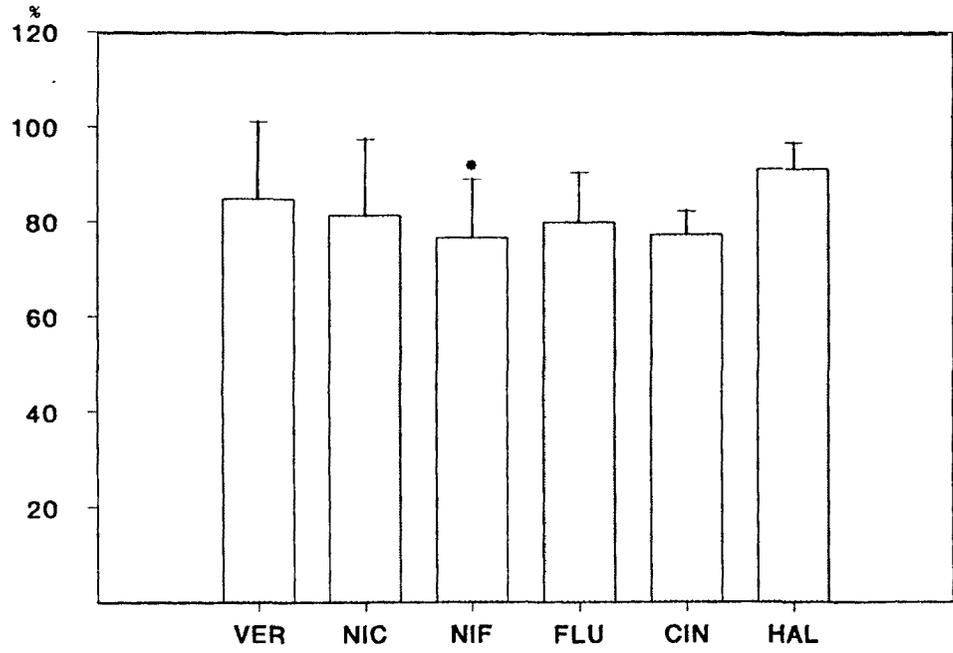
A: niveles de DA. Los valores encontrados en los animales control fueron 1433.17±111.34 ng/g de tejido (n=22). *p<0.05.

B: niveles de DOPAC. Los valores encontrados en los animales control fueron 575.47±58.84 ng/g de tejido (n=23). *p<0.05 **p<0.01.

C: niveles de HVA. Los valores encontrados en los animales control fueron 182.70±18.16 ng/g de tejido (n=23). **p<0.01.

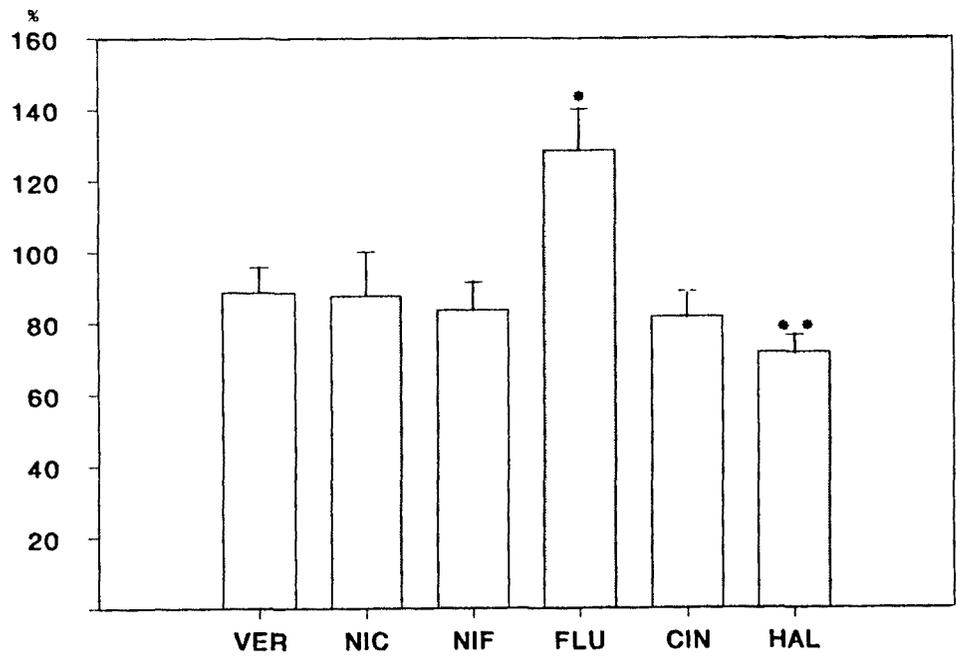
DA

A



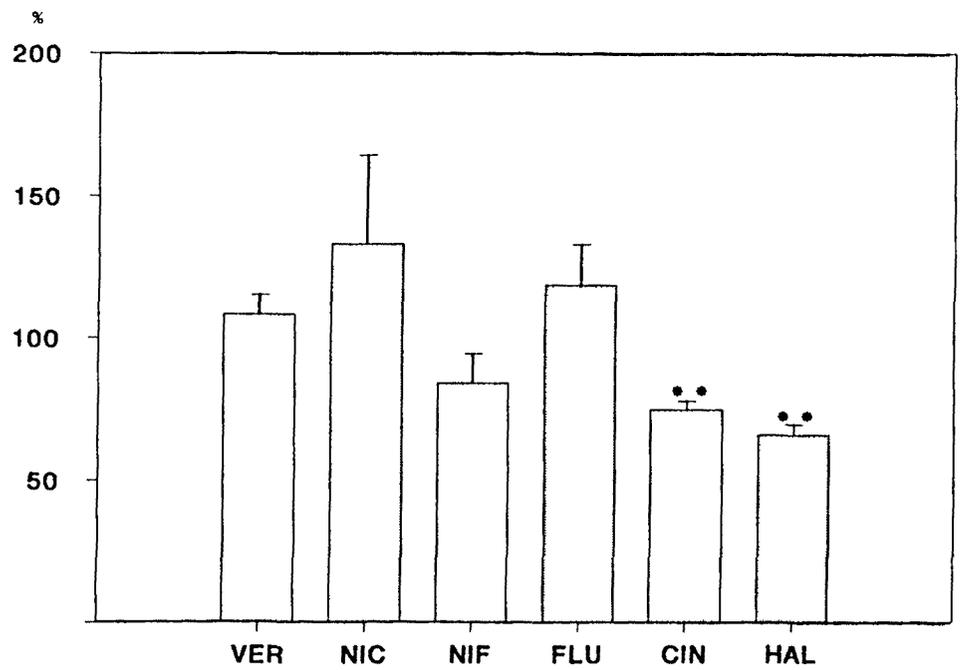
DOPAC

B



HVA

C



3.2.2. ESTUDIOS EN LIQUIDO EXTRACELULAR ESTRIATAL DE CEREBRO DE RATA.

Las fibras de diálisis implantadas en el estriado de ratas moviéndose libremente permitieron la medida de niveles basales de dopamina, DOPAC y HVA a las 48 horas de la implantación. Los niveles basales fueron (media \pm SEM, n=número de animales), dopamina (0.064 ± 0.0006 pmoles/20 min, n=55); DOPAC (16.80 ± 0.57 pmoles/20 min, n=55) y HVA (11.73 ± 0.54 pmoles/20 min, n=55).

3.2.2.1. Efecto de una única administración de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos.

Butirofenonas.

El haloperidol causó una elevación de la DA en líquido extracelular que fue observada ya a los cuarenta minutos de su administración llegando al 120% pasada la primera hora y no mostrando tendencia a volver a los valores basales a las cuatro horas de su ingesta. (Fig. 10, A)

Además provocó un incremento marcado de ambos metabolitos que llegó a ser superior al 200% con comienzo a los 40 minutos de su ingesta, que continuaba al final de la perfusión. (Fig. 10, B y C)

Difenilalquilaminas.

La flunaricina produjo un aumento de niveles de DA que comenzó alrededor de las tres horas de su aplicación con un 52% llegando al 119% a las cinco horas. A las seis horas mostraba una tendencia al descenso. (Fig. 10, A)

La cinaricina no dió lugar a cambios significativos en los niveles de DA en un periodo de diálisis de tres horas. (Fig. 11, A)

La flunaricina aumentó los valores de ambos metabolitos de un modo pequeño pero significativo (25-50%) desde las tres horas de su administración hasta el final de la diálisis no mostrando tendencia a la recuperación. (Fig. 10, B y C)

No se observaron cambios significativos en los niveles de metabolitos dopaminérgicos en el líquido extracelular tras una dosis de cinaricina en un periodo de diálisis de tres horas. (Fig. 11, B y C)

Fenilalquilaminas.

Tras una administración de verapamil, no se observaron diferencias en la DA extracelular ni en sus metabolitos con respecto al control en un periodo de diálisis de tres horas. (Fig. 11, A, B y C)

1,4 Dihidropiridinas.

La nicardipina dió lugar a un 92% de incremento en los valores extracelulares de DA a la hora y veinte minutos de su administración con recuperación posterior de los niveles basales. (Fig. 10, A)

Con una dosis de nifedipina no se encontraron cambios en la dopamina extracelular. (Fig. 11, A)

Ni la nicardipina ni la nifedipina modificaron de un modo apreciable los niveles de los metabolitos de la dopamina. (Figs. 10 y 11, B y C)

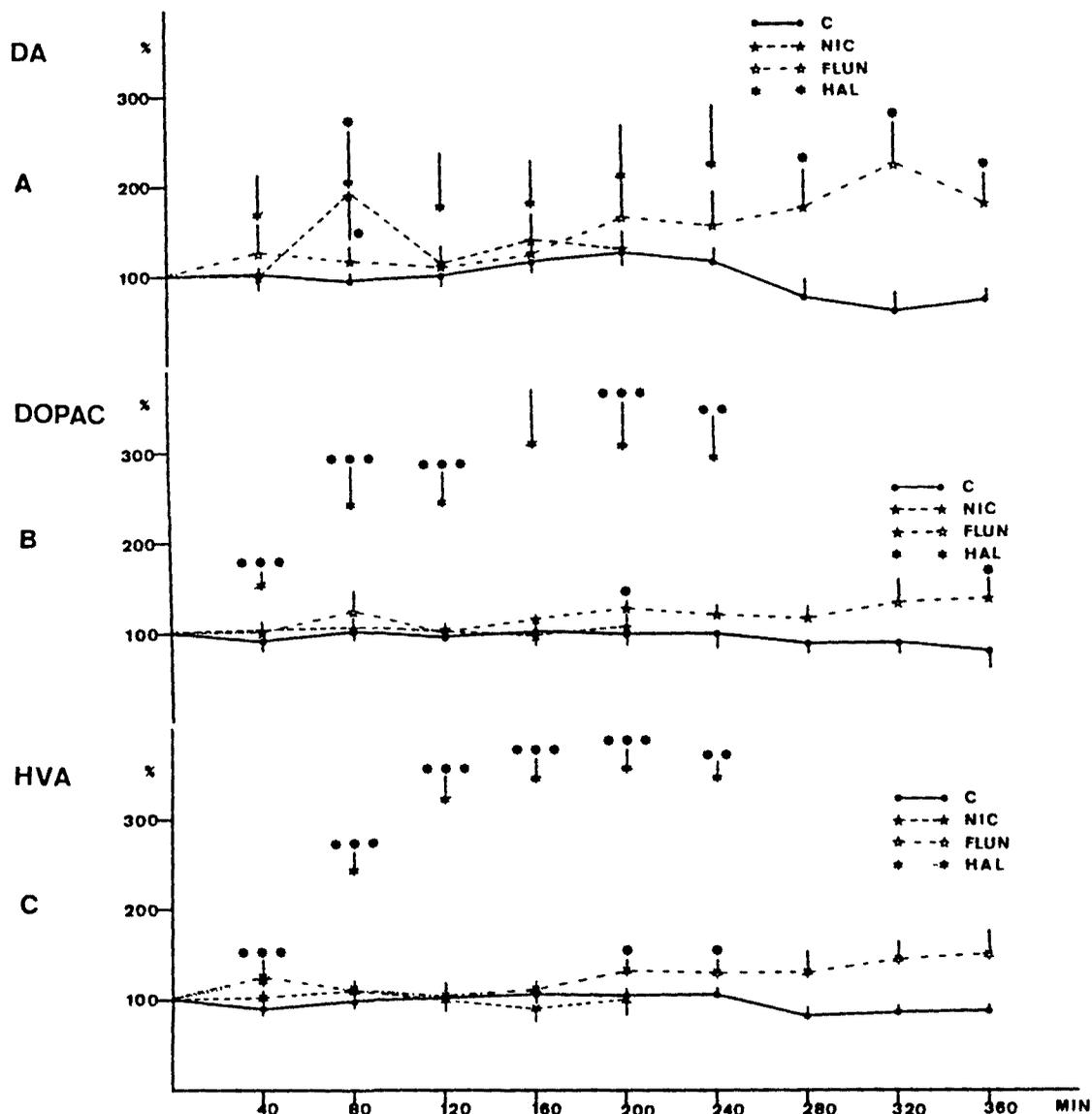


Fig. 10. Efecto de una administración oral de haloperidol o de una dosis media de nicardipina o flunaricina sobre los niveles extracelulares estriatales de DA y sus metabolitos en ratas despiertas.

Los datos se expresan como % (media \pm SEM, n=6 animales) de la media de las tres muestras basales recogidas inmediatamente antes de la administración de la droga o del vehículo. Los cambios estadísticos se miden con la U de Mann-Whitney en cada punto del tiempo con respecto a los valores control en el mismo punto. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

- A: niveles de DA.
- B: niveles de DOPAC.
- C: niveles de HVA.

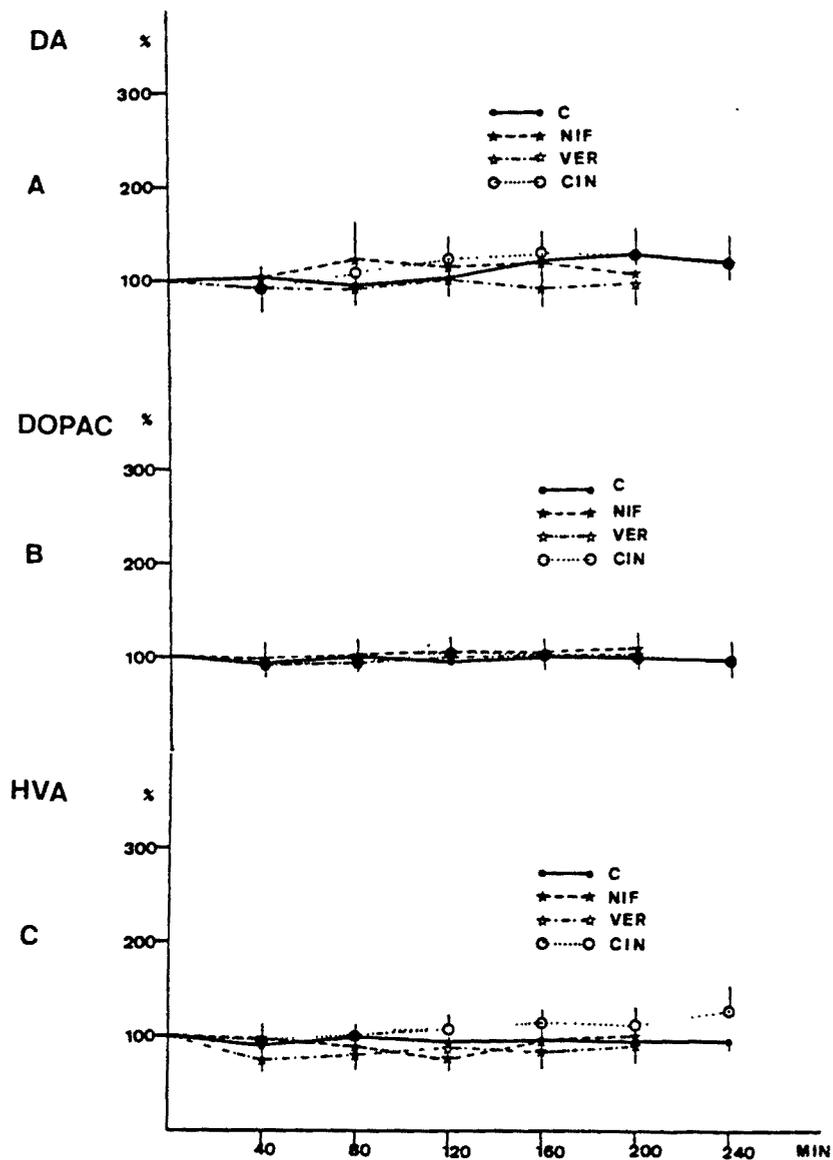


Fig. 11. Efecto de la administración oral de una dosis media de nifedipina, verapamil o cinnarizina sobre los niveles extracelulares estriatales de DA y sus metabolitos en ratas despiertas.

Los datos se expresan como % (media \pm SEM, n=6 animales) de la media de las tres muestras basales recogidas inmediatamente antes de la administración de la droga o del vehículo. Los cambios estadísticos se miden con la U de Mann-Witney en cada punto del tiempo con respecto a los valores control en el mismo punto.

A: niveles de DA.

B: niveles de DOPAC.

C: niveles de HVA.

3.2.2.2. Efecto de la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos.

Butirofenonas.

El haloperidol incrementó los valores de DA de un modo cercano a la significatividad ($p \approx 0.1$). (Fig. 12, A)

También aumentó los niveles de ambos metabolitos en líquido extracelular estriatal. Dicho incremento fue significativo en el caso del DOPAC. (Fig. 12, B y C)

Difenilalquilaminas.

La cinaricina dió lugar a un comportamiento similar al del haloperidol en los niveles de DA y DOPAC, no significativo. (Fig. 12, A, B y C)

La flunaricina por su parte produjo un descenso significativo en los niveles de dopamina extracelular (Fig. 12, A) y de los niveles de DOPAC y HVA que fue significativo para éste último. (Fig. 12, B y C)

Fenilalquilaminas.

El verapamil no originó cambios aparentes en los niveles extracelulares de DA. (Fig. 12, A)

Sin embargo, incrementó de un modo significativo los valores extracelulares de HVA. (Fig. 12, B y C)

1,4 dihidropiridinas.

Las ratas tratadas con nicardipina o nifedipina mostraron niveles elevados de DA en líquido extracelular estriatal que resultaron significativos en el caso de la nifedipina. (Fig. 12, A)

En cambio, ni la nicardipina ni la nifedipina dieron lugar a alteraciones en los niveles extracelulares de ambos metabolitos. (Fig. 12, B y C)

Fig. 12. Efecto del tratamiento crónico con haloperidol o con dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio sobre los niveles de DA y sus metabolitos en líquido extracelular estriatal de ratas despiertas.

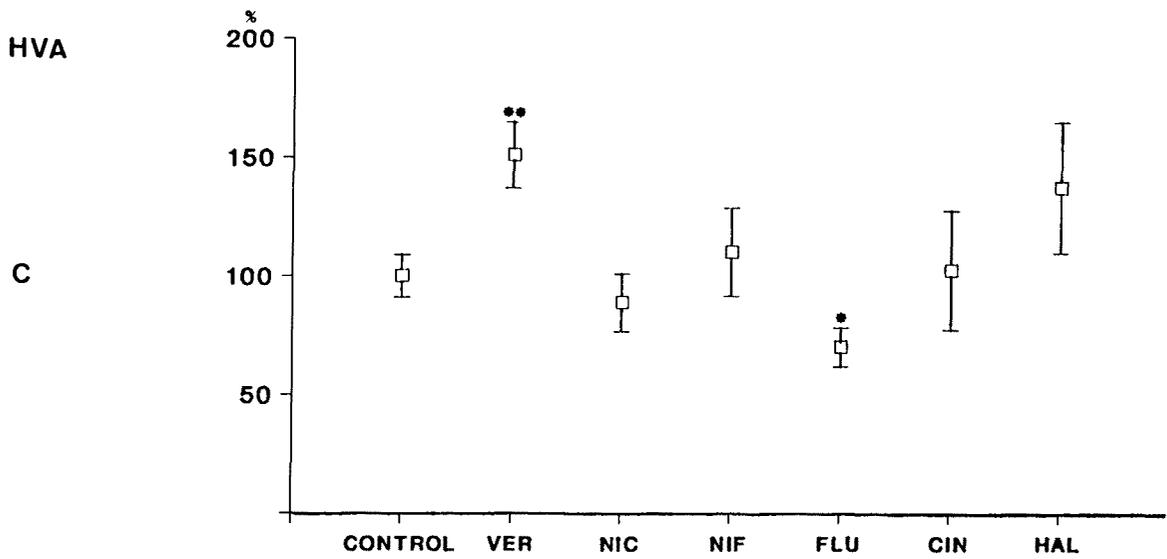
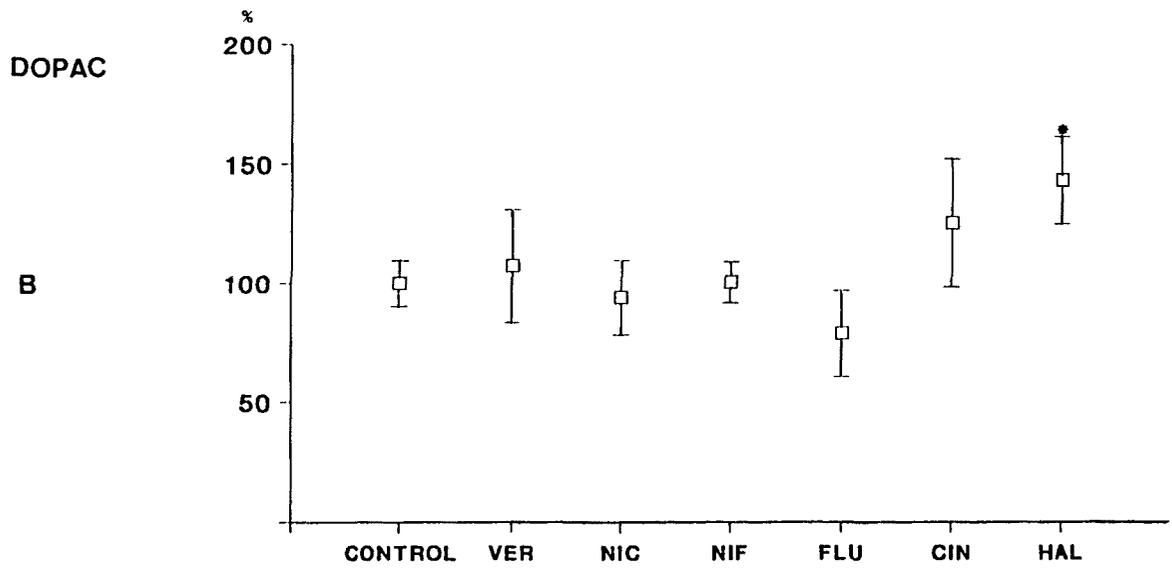
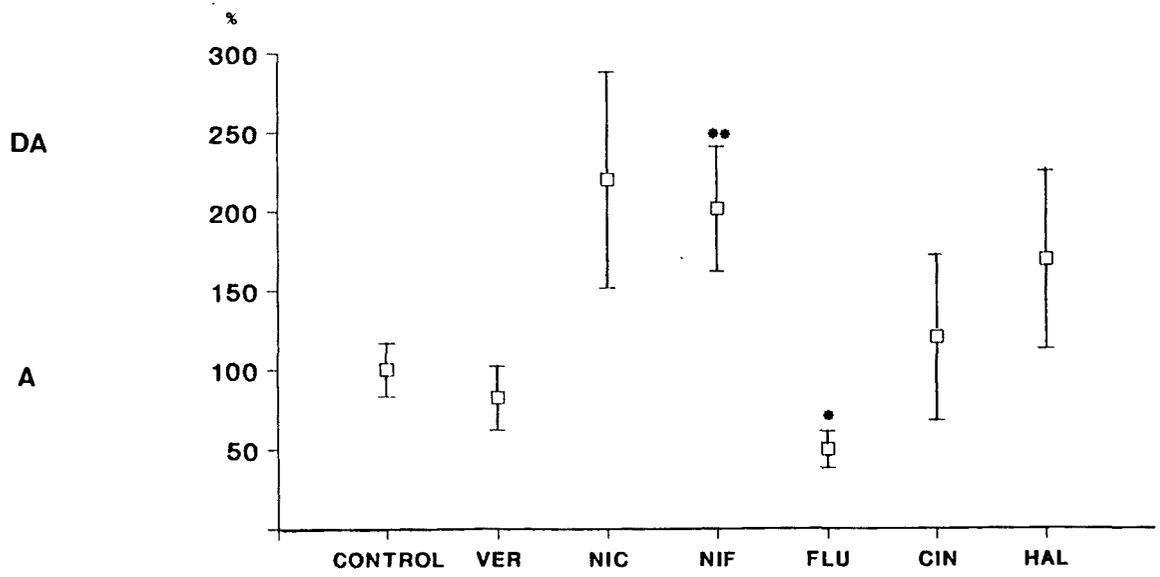
Los animales recibieron 18 dosis orales (1/día) de cada fármaco o del vehículo correspondiente y fueron dializados a las 24 horas de finalizado el tratamiento y 48 horas de la implantación de la fibra de diálisis.

Los datos se expresan como % (media \pm SEM, n=n° de animales) de los valores correspondientes al grupo tratado con vehículo, con respecto al cual se realizó la comparación estadística mediante una U de Mann-Witney. El número de animales por grupo fué: VER 7, NIC 6, NIF 7, FLU 8, CIN 6 y HAL 6.

A: niveles de DA. Los valores encontrados en los animales control fueron 1.25 ± 0.21 fmoles/min (n=17) *p<0.05 **p<0.01.

B: niveles de DOPAC. Los valores encontrados en los animales control fueron 710 ± 69 fmoles/min (n=17) *p<0.05.

C: niveles de HVA. Los valores encontrados en los animales control fueron 61.65 ± 5.50 fmoles/min (n=17) *p<0.05 **p<0.01.



3.2.2.3. Efecto de la despolarización producida por potasio sobre los niveles extracelulares de dopamina y sus metabolitos tras la administración crónica de haloperidol o de dosis medias de fármacos antagonistas de canales de calcio.

Vehículo.

Las ratas tratadas con vehículo respondieron con un incremento en los niveles de DA extracelular de un 86% a los 20 minutos de la administración de cloruro potásico, que resultó cercano a la significatividad ($p \approx 0.1$) y tendió a una recuperación rápida. (Fig. 13)

Además, el potasio dió lugar a un descenso significativo en los niveles de DOPAC y HVA a los 40 minutos, y en el caso del HVA también a los 60 minutos, del comienzo de su administración intracerebral. (Fig. 13)

Butirofenonas.

Los animales a los que se había administrado haloperidol de un modo repetido, respondieron al estímulo del potasio con un pequeño incremento, no significativo, en los niveles de DA extracelular. Los cambios tampoco fueron significativos con respecto a las ratas control. (Fig. 14)

Con respecto a los metabolitos, el estímulo con potasio produjo un descenso en los niveles de DOPAC ya desde los 20 minutos, que se acercó a la significatividad a los 40 minutos ($p \approx 0.1$) y en los niveles de HVA próximo a la significatividad ($p \approx 0.1$) a los 40, y significativo a los 60 minutos de la administración del estímulo. Con respecto a las ratas control no

hubo cambios significativos. (Fig. 14)

Difenilalquilaminas.

Las ratas tratadas con cinaricina respondieron al estímulo despolarizante con un incremento mantenido en los niveles de DA que duró todo el período de administración del potasio y que fue significativo a los 20 minutos. Los valores encontrados a los 60 minutos fueron significativamente superiores a los de las ratas control. (Fig. 15)

Tras el tratamiento con flunaricina se observó un ascenso (123%), cercano a la significatividad ($p \approx 0.09$), de los niveles de DA a los 20 minutos de comenzada la administración del potasio con tendencia a la recuperación. Los cambios no fueron significativos con respecto a las ratas control. (Fig. 16)

En las ratas pretratadas con cinaricina hubo un incremento pequeño pero significativo en los niveles de DOPAC a los 20 minutos. Se produjo un descenso en los valores de HVA cercano a la significatividad ($p \approx 0.08$) a los 40 minutos y significativo a los 60 minutos de comenzada la administración de potasio. (Fig. 15)

Por su parte, las ratas tratadas previamente con flunaricina respondieron al estímulo con potasio con un descenso significativo en los niveles de DOPAC y próximo a la significatividad ($p \approx 0.09$) de HVA, a los 40 minutos. (Fig. 16)

Los cambios observados en los niveles de los metabolitos en los animales pretratados con uno u otro de los dos fármacos en respuesta al estímulo con potasio no fueron significativos con respecto a las ratas control.

Fenilalquilaminas.

Las ratas pretratadas con verapamil respondieron al potasio con un incremento mantenido en los niveles de DA que no resultó significativo ni con respecto a sí mismas ni con respecto a las ratas control. (Fig. 17)

Con respecto a los metabolitos, no hubo cambios en sus niveles después del estímulo con potasio ni se encontraron diferencias significativas con respecto a las ratas control. (Fig. 17)

1,4 Dihidropiridinas.

El estímulo con potasio incrementó los niveles extracelulares de DA en un 134% en ratas tratadas previamente con nicardipina. Este incremento fue tardío, a los 40 minutos, y no resultó significativo. (Fig. 18)

Por su parte el pretratamiento con nifedipina dió lugar a un aumento de un 350% en los niveles de DA extracelular, con tendencia a la recuperación, como respuesta al potasio, no significativo. (Fig. 19)

Con ninguno de los dos fármacos, los cambios observados resultaron significativamente diferentes con respecto a las ratas control.

No se observó respuesta en los niveles de metabolitos al estímulo con potasio. En el caso de la nifedipina los valores de DOPAC a los 40 minutos y de HVA a los 60 minutos se encontraron significativamente superiores a los de las ratas control. Los valores pertenecientes a las ratas tratadas con nicardipina no presentaron diferencias significativas con respecto a las ratas control. (Figs. 18 y 19)