

R-11925
T 938

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE TETRAZEPAM Y DILTIAZEM

EN

MUSCULATURA LISA TRAQUEAL.

TESINA DE LICENCIATURA

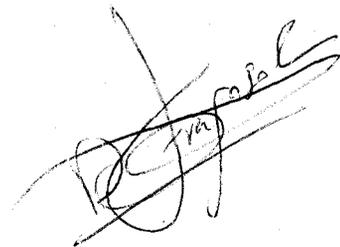
David Frago so Rovira

LBS 500432

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE FARMACIA,
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y
FARMACOLOGÍA.**

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE TETRAZEPAM Y DILTIAZEM
EN MUSCULATURA LISA TRAQUEAL."**

Trabajo para aspirar
al grado de Licenciado
en Farmacia que presenta.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'David Frago Rovira', written over a set of horizontal lines.

DAVID FRAGOSO ROVIRA.

Elisa Marhuenda Requena, Catedrática de Farmacodinamia y Directora de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Farmacología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que el presente trabajo, "ESTUDIO COMPARATIVO DE TETRAZEPAM Y DILTIAZEM EN MUSCULATURA LISA TRAQUEAL", ha sido realizado en dicho Departamento, bajo mi dirección, la de la Dra. M^a Dolores Herrera González y la de la Dra. M^a Concepción Pérez Guerrero, reuniendo los requisitos necesarios para este tipo de trabajo.

Y para que conste, firmo el presente.

En Sevilla, a 5 de Noviembre de 1996.

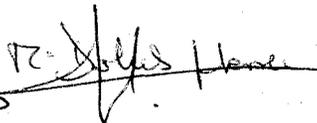
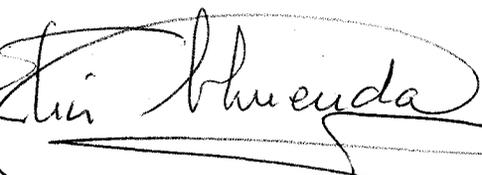
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elisa Marhuenda Requena', written over a horizontal line.

Fdo: Elisa Marhuenda Requena.

ELISA MARHUENDA REQUENA, M^a DOLORES HERRERA
GONZÁLEZ Y M^a CONCEPCIÓN PÉREZ GUERRERO.

CERTIFICAN: Que la Tesina de Licenciatura titulada "ESTUDIO
COMPARATIVO DE TETRAZEPAM Y DILTIAZEM EN MUSCULATURA LISA
TRAQUEAL", realizada por DAVID FRAGOSO ROVIRA, para aspirar al grado de
Licenciado, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

En Sevilla, a 5 de Noviembre de 1996.



Fdo: E. Marhuenda Requena M^a D. Herrera González M^a. C Pérez Guerrero

Agradezco a la Dra. Elisa Marhuenda Requena su labor de dirección y orientación; así como su gran interés y su entera disposición hacia este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Dolores Herrera González y a la Dra. M^a Concepción Pérez Guerrero por su ayuda, enseñanzas y buenos consejos que no me han faltado durante la investigación y redacción de esta Tesina.

Quisiera también agradecer a mis compañeros de Departamento el apoyo que me han mostrado, y muy especialmente a María sin la cual apenas podría haber atisbado el final de esta Tesina.

A mi familia agradezco la comprensión y el cariño que me brindan en todos mis proyectos, incluidos los más absurdos.

*A mi hermana Ana ,
con todo mi cariño.*

INDICE

I.- OBJETO	1
II.- ANTAGONISTAS DEL CALCIO	3
II.1.- INTRODUCCIÓN	3
II.2.- HISTORIA	5
II.3.- PROPIEDADES MOLECULARES DE LOS CANALES DE CALCIO	7
II.3.1.- Tipos de canales de calcio	9
II.3.1.- Estructura molecular del canal de calcio tipo L ...	12
II.4.- CLASIFICACIÓN	16
II.5.- MECANISMO DE ACCIÓN	18
II.6.- SELECTIVIDAD TISULAR	20
II.7.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS.....	21
II.7.1.- A nivel cardiovascular	21
II.7.1.1.- Acción sobre la fibra lisa vascular	23

II.7.1.2.- Acciones electrofisiológicas	26
II.7.2.- A nivel renal	27
II.7.3.- A nivel metabólico.....	28
II.7.3.1.- Metabolismo glucídico	28
II.7.3.2.- Metabolismo lipídico	29
II.7.4.- Otras acciones	31
II.7.4.1.- Acción broncodilatadora	33
II.7.4.2.- Acción citoprotectora	34
II.8.- REACCIONES ADVERSAS E INTERACCIONES	35
II.8.1.- Reacciones adversas	35
II.8.2.- Interacciones medicamentosas	36
II.9.- INDICACIONES TERAPÉUTICAS	38
II.10.- CONTRAINDICACIONES	44

III.- PARTE EXPERIMENTAL	45
III.1.- CONDICIONES GENERALES	45
III.1.1.- Animales de experimentación	45
III.1.2.- Fármacos ensayados y preparación	
de soluciones	46
III.1.3.- Expresión de resultados	48
III.1.4.- Análisis estadístico	48
III.2.- TRÁQUEA AISLADA DE RATA Y COBAYA.....	49
III.2.1.- Descripción de la técnica	49
III.3.- CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCl (120mM)	50
III.3.1.- Desarrollo de la experiencia	50
III.3.2.- Resultados	51

III.4.- CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CARBACOL	53
III.4.1.- Desarrollo de la experiencia	53
III.4.2.- Resultados	54
III.5.- CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CaCl₂ EN MEDIO	
NOMINALMENTE LIBRE DE Ca²⁺	62
III.5.1.- Desarrollo de la experiencia	62
III.5.2.- Resultados	63
IV.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	68
V.- CONCLUSIONES	71
VI.- BIBLIOGRAFÍA	72

OBJETO

I.- OBJETO.

En el conjunto de los avances científicos de la moderna Farmacología ocupa una importante parcela el campo de las benzodiazepinas, estos agentes no han perdido actualidad a pesar de que se conocieron hace 25 años.

No se puede decir que en este tiempo, se hayan descubierto nuevas acciones farmacológicas, sus indicaciones clínicas siguen siendo prácticamente las mismas, pero su estudio ha proporcionado nuevos avances moleculares relacionados con el conocimiento de la estructura que interactúa con las benzodiazepinas de manera específica íntimamente asociada al complejo molecular del receptor **GABA**; se ha conocido la existencia de subtipos de receptores benzodiazepínicos en función de la distinta afinidad de las moléculas; se ha puesto en evidencia la existencia de ligandos endógenos, su localización tanto a nivel del **S.N.C.** como a nivel periférico, etc.

Todos estos conocimientos han permitido establecer analogías estructurales con las subunidades de otros receptores asociados a canales iónicos. Esto ha llevado a proponer que todos los receptores que tras la fijación de un transmisor son capaces de abrir o cerrar un canal iónico, se asocian en una superfamilia de receptores y, que el proceso evolutivo permite su diversificación, diferenciación y especialización (Barnard y col., 1987).

Concretamente desde 1980 ya se sugirió un papel importante de benzodiazepinas como reguladoras de canales de Ca^{2+} en tejidos periféricos (Mestre y cols., 1985).

Los canales de Ca^{2+} se encuentran localizados en multitud de células excitables y no excitables como linfocitos y ciertos fibroblastos y sufren continuos cambios de transición entre estados conformacionales de apertura, cierre o inactivación. Los agentes capaces de bloquear los canales de Ca^{2+} favorecen el estado conformacional cerrado, restringiendo así el acceso de calcio extracelular al interior de la célula, en donde ejerce su papel de segundo mensajero en la regulación de varios procesos fisiológicos.

El desacoplamiento electromecánico que producen los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} se refleja en una relajación de la musculatura lisa y estriada.

Merece la pena seguir en esta línea de trabajo, intentando establecer una probable relación entre el mecanismo de acción a nivel periférico de **TETRAZEPAM**, con los movimientos de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje, línea ya iniciada hace tiempo en el Departamento y que nos ha permitido obtener resultados muy interesantes.

ANTAGONISTAS

DEL CALCIO

II.- ANTAGONISTAS DEL CALCIO.

II.1.- INTRODUCCIÓN .

Los bloqueantes de los canales de calcio constituyen un grupo de fármacos introducidos en práctica clínica a comienzo de los años setenta. Son un conjunto muy heterogéneo cuyas propiedades farmacológicas se deben directamente a su capacidad para inhibir el flujo de entrada de calcio a través de los canales voltaje-dependientes específicos de este ión, que se encuentran en las membranas de las células excitables. Estos fármacos actúan preferentemente sobre los canales dependientes de voltaje de tipo L y son prácticamente inactivos sobre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T. El resultado final de sus efectos en los vasos sanguíneos será la disminución del calcio intracelular libre para combinarse con la calmodulina, produciendo una relajación vascular (vasodilatación). Por otro lado, el bloqueo de la entrada de calcio en el miocardio produce una disminución de la fuerza y de la frecuencia de contracción del músculo cardíaco. Son éstas las bases de sus mayores aplicaciones en clínica, ya que se han convertido en el avance más importante en el campo de la terapéutica cardiovascular desde la introducción de los bloqueadores beta.

La gran heterogeneidad de este grupo hace que sus componentes muestren diferentes acciones farmacológicas y efectos terapéuticos. El criterio que permite diferenciarlos mejor es la gran actividad vasodilatadora de las dihidropiridinas, mientras que otros antagonistas del calcio como verapamilo y diltiazem manifiestan preferentemente propiedades cardiodepresoras. El efecto antihipertensivo de nifedipino y la actividad antiarrítmica de verapamilo constituye un claro ejemplo de los diferentes espectros terapéuticos de los antagonistas del calcio .

El papel del calcio como mediador de la excitación celular y su respuesta es bien conocido. Las células mantienen una baja concentración de calcio intracelular, mantenida directamente por un gradiente del ión calcio. En ausencia de los mecanismos de control apropiados el calcio está envuelto en sucesos patológicos, incluyendo la destrucción celular y la muerte.

II.2.- HISTORIA .

En 1962, Hass y Hartfelder encontraron que verapamilo, un posible vasodilatador coronario, poseía unos efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos que no se observaban con otros agentes vasodilatadores como nitroglicerina. Dos años más tarde, Fleckenstein sugirió que el efecto inotrópico negativo se debía a la inhibición del acople excitación-contracción, estando implicada la reducción del movimiento del Ca^{2+} en los miocitos cardíacos (Fleckenstein y cols., 1967).

Más tarde, investigadores como Rougier, Corabouef y cols. comprobaron que la despolarización del tejido auricular estaba mediada por dos corrientes iónicas dirigidas hacia el interior (Rougier y col. 1969). Una de ellas, es el denominado *canal rápido del Na^+* que se forma cuando llega el potencial transmembrana de una célula cardíaca al umbral, aumentando la conductancia para el Na^+ de forma rápida y pronunciada. La segunda corriente necesita más tiempo hasta alcanzar su valor máximo y está causada en gran parte por el movimiento de Ca^{2+} hacia el interior de la célula a través de un poro llamado *canal lento* o *canal del Ca^{2+}* . Este movimiento de Ca^{2+} contribuye al mantenimiento de la fase estacionaria del potencial de acción cardíaco (Rougier y cols. 1969). Un derivado de verapamilo, D-600(galopamilo) bloquea

el movimiento del Ca^{2+} a través del canal lento, por lo que altera la fase estacionaria del potencial de acción cardíaco (Kohlhardt y cols., 1972).

El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero en determinados procesos fisiológicos en células excitables, entre los que destacan :

1)El acoplamiento excitación-contracción (imprescindible en dicho proceso) (Fleckenstein.1977).

2)La despolarización y excitabilidad de células del nodo sinoauricular (Tamargo. 1986).

3)Acoplamiento excitación-secreción.

4)La excitabilidad neuronal (Nayler . 1988).

5)La liberación de neurotransmisores.

6)La división celular.

7)Etc...

II.3.- PROPIEDADES MOLECULARES DE LOS CANALES DE CALCIO.

Los canales de Ca^{2+} son estructuras macromoleculares insertadas en la bicapa lipídica de células vasculares lisas, neuronas, células endocrinas, etc. , en las cuales el calcio juega un papel regulador crucial activando diversos procesos fisiológicos, lo que pone de manifiesto la importancia de estos canales respecto a los de sodio o potasio cuya función únicamente está limitada a la transferencia de cargas de repolarización y despolarización (Gandía y cols. 1990).

Están constituidos por una glicoproteína, de configuración más o menos cilíndrica, con un poro central de naturaleza acuosa de aproximadamente 6 Å de diámetro y vida media de 40 horas. La permeabilidad característica de estos canales hace pensar en dos conceptos para explicar el paso de determinados iones:

1) Selectividad por rechazo:

-Por su tamaño: El paso de cationes de radio mayor que el Ca^{2+} no estaría permitido.

-Por su afinidad: El Ca^{2+} no podrá ser desplazado por iones con menor afinidad.

2) Selectividad por afinidad:

- Si las zonas de fijación del Ca^{2+} están libres, entonces otros iones tendrán acceso a ellas. Por otro lado la fijación de determinados cationes (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y La^{3+}) es más fuerte que la del Ca^{2+} , impidiendo su paso y produciendo un bloqueo (Nayler . 1988).

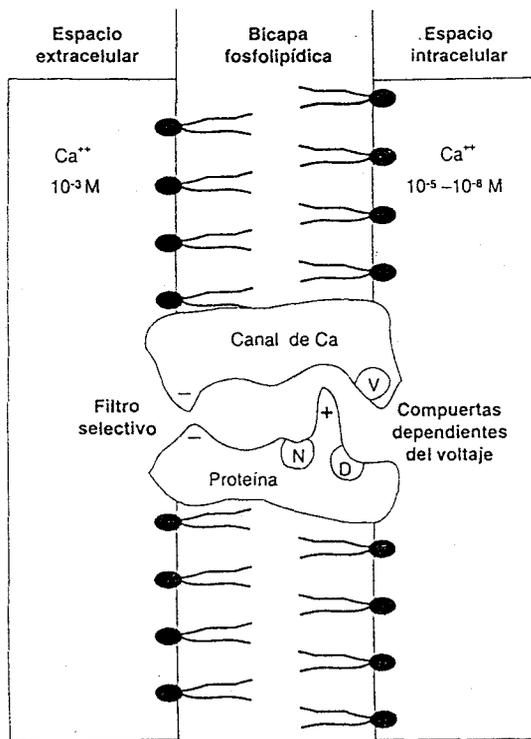


Fig 1. Esquema del canal de calcio

II.3.1.-Tipos de canales de calcio.

Los canales de calcio de la membrana celular pueden ser divididos, en lo que respecta al mecanismo que los activa, en canales dependientes de voltaje (**VOCs**) (activados por la despolarización celular) y canales operados por receptores (**ROCs**) (activados por agonistas específicos, tales como la noradrenalina, la angiotensina, la serotonina, etc.). Los principales efectos farmacológicos de los bloqueadores del Ca^{2+} en el hombre resultan del bloqueo de los canales dependientes de voltaje; razón por la cual serán analizados más detenidamente.

La utilización de la técnica de inclusión de fragmentos de membrana o "patch-clamp" a través de la cual se puede cuantificar la pequeña cantidad de corriente que pasa por un canal iónico durante una sola apertura, ha posibilitado la identificación de varios subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje:

-L (de large): Se activa por alto potencial de membrana (-10mv) y es el único canal bloqueado por los antagonistas del calcio típicos y son especialmente sensibles a los agentes derivados de la dihidropiridina (Tytgat y cols. 1988). El calcio que entra por estos canales aumenta notablemente las concentraciones citoplasmáticas hasta llegar al umbral necesario para activar

la máquina contráctil (filamentos de actina-miosina) (Bosnjak, 1993). Los canales tipo L dependientes de voltaje, para los que ya se han propuesto diferentes subtipos (Neveu y cols., 1993) son los mayoritarios y los más importantes desde un punto de vista funcional en la mayor parte de los vasos sanguíneos. Estos canales regulan el acoplamiento electromecánico vascular y cardíaco, la duración del potencial de acción celular, la despolarización de los nodos SA y AV cardíacos y la expresión de protooncogenes.

-T (de transient): Activado por potenciales de membrana muy negativos (-70mv). Son insensibles los derivados de la dihidropiridina y bloqueado por amilorida (diurético que bloquea los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y Na^+/H^+) (Orallo, 1992). Estos canales van a permitir el transporte al interior de la célula de una pequeña corriente pasajera de iones calcio que incrementa la concentración intracelular libre de este ión. Esto lleva consigo la liberación de más calcio de sus depósitos intracelulares de almacenamiento, fundamentalmente del depósito sensible al inositoltrifosfato (IP_3) identificado con el retículo sarcoplásmico profundo, aunque también puede participar el sensible a rianodina identificado con el retículo sarcoplásmico superficial. Estos canales parecen regular la actividad automática celular y la liberación de neurotransmisores.

-N (de neuron): Presentes en terminaciones nerviosas y cuya función es la liberación de neurotransmisores. Es bloqueado por ω -conotoxina y al igual que el L también es activado por altos potenciales de membrana. Estos canales regulan la liberación de neurotransmisores cerebrales y la frecuencia de las descargas neuronales (Spedding . 1987).

Debe de tenerse en cuenta que la entrada de calcio a través de los tipos de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y T no es continua, sino solamente transitoria, ya que se inactivan con gran rapidez.

La diferenciación de los tres tipos de canales se puede llevar a cabo con el empleo de distintos fármacos o toxinas.

Últimamente se ha descrito la existencia de otros canales de calcio con características cinéticas diferentes (Kostyuk. 1989). El más estudiado es el P, abundante en las células de Purkinje y que se caracteriza por ser activado a potenciales inferiores a -50mv y ser insensible a las 1,4-dihidropiridinas y a la ω -conotoxina (Tsien . 1991).

Respecto al recambio de los canales de calcio hay que decir que es un proceso biológico sometido a procesos de síntesis y destrucción. La síntesis se realiza en los ribosomas, desde donde son traslocados hacia la luz del retículo

endoplasmático rugoso, canalizados en vesículas hacia el aparato de Golgi y desde allí lanzados a la membrana celular. El proceso de desintegración puede realizarse bien por que sean expulsados al exterior donde serán hidrolizados por enzimas *in situ*, o bien que sean transferidos al interior de la célula donde serán inactivados por enzimas lisosomales (Triggle y cols., 1986).

Toda esta heterogeneidad, que radica en sus características cinéticas, umbral de activación, su sensibilidad a agonistas y antagonistas del calcio y a las toxinas naturales, supone una enorme ventaja ya que es posible el desarrollo de nuevas moléculas que ejerzan su efecto en una subclase del canal de un determinado órgano o tejido consiguiendo así acciones farmacológicas en zonas concretas del organismo evitando la aparición de efectos colaterales indeseables.

II.3.2.- Estructura molecular del canal de Ca^{2+} tipo L.

Debido a su carácter mayoritario, a su gran importancia funcional y a que son los canales que bloquean los fármacos que hoy día más se utilizan en la patología cardiovascular, nos ha parecido importante centrarnos un poco más a fondo en la estructura de este canal.

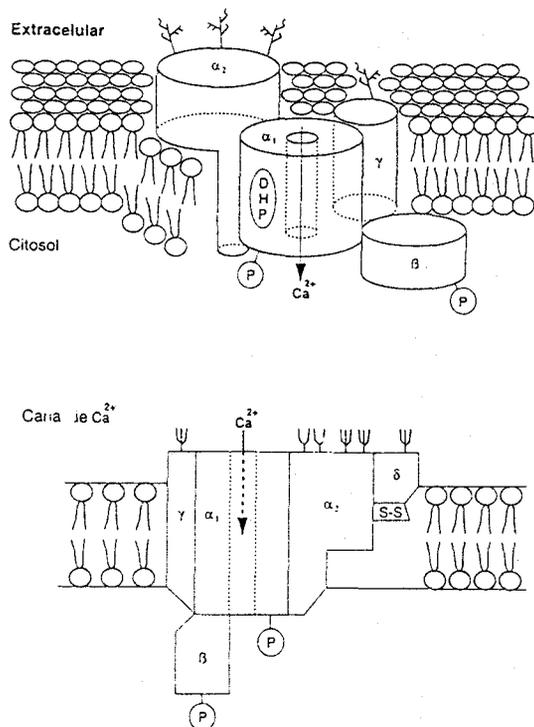


Fig. 2 . Estructura molecular del canal de Ca^{2+} tipo L.

Está constituido por una glucoproteína embebida en la bicapa lipídica de la membrana plasmática. En ella se contempla una parte externa muy hidrófila, altamente glucosidada, una porción hidrófoba en el interior de la doble bicapa lipídica y una parte hidrófila intracitoplasmática susceptible de fosforilación. En dicha glucoproteína se diferencian al menos cuatro subunidades: alfa-1 (175 KD), alfa-2 (135-143 KD), beta (52-54) y gamma (33 KD) (algunos autores destacan una delta (24-33 KD) (Campbell y cols. 1988; Catterall, 1988). Las subunidades alfa-1 y beta contienen zonas de

fosforilación, pudiendo estar relacionados con el transporte de nucleósidos. También se aprecia el poro acuoso del canal, de aproximadamente 6 Å de diámetro a través del cual circula el calcio. Se encuentra en la zona central (alfa-1) y tiene una configuración más o menos cilíndrica.

Además estos canales presentan :

-Filtros de selectividad en el poro acuoso, posiblemente con aminoácidos cargados negativamente que rechazan aniones y evitan el paso de moléculas de elevado peso molecular (selección por rechazo). Por otro lado, la selección se realiza por afinidad y así iones de menor radio que el calcio, como el sodio, tampoco pueden atravesarlo en presencia de calcio extracelular.

-Dos compuertas, una de activación y otra de inactivación, cuya cinética estaría modulada por el sensor de voltaje, al acusar las modificaciones del potencial de membrana (Catterall y cols. 1993).

Según la posición de esas compuertas el canal puede encontrarse en tres estados:

1) Abierto, activado o modo 2: La compuerta de activación está abierta y la de inactivación semiabierta, permitiendo la entrada de calcio (Está favorecido por los agonistas de los canales de calcio).

2) Reposo o modo 1 : El canal oscila entre un estado de apertura y cierre. La compuerta de activación está cerrada y la de inactivación abierta. No permite la entrada de calcio salvo si el canal se activa.

3) Cerrado, inactivado o modo 0: El canal no se puede abrir. La compuerta de activación está abierta mientras la de inactivación está cerrada (Delgado y cols, 1990). Las dihidropiridinas presentan mayor afinidad por el canal de calcio en este estado.

-Un sensor de voltaje que modula la cinética de las compuertas según el nivel de potencial de membrana, de forma que la despolarización de la membrana facilita la apertura del canal voltaje-dependiente tipo L.

II.4.- CLASIFICACION.

La mayoría de los antagonistas del calcio conocidos son sintéticos, y desde un punto de vista químico los podemos dividir en dos grandes grupos:

1) Inorgánicos : Aquí aparecen algunos cationes polivalentes como el cadmio (Cd^{2+}), cobalto (Co^{2+}), níquel (Ni^{2+}), etc... Estos cationes no se unen específicamente a la subunidad alfa-1, sino que lo que hacen es provocar un bloqueo físico del poro central impidiendo el paso del calcio. No se usan en clínica por su elevada toxicidad.

2) Orgánicos : En este caso su acción farmacológica sí es debida a una unión a sitios específicos de fijación situados en la subunidad alfa-1. Esa fijación provocará cambios conformacionales en la estructura del canal, y debido a esos cambios se modificaran la posición de las puertas disminuyendo la duración del estado abierto y el intervalo de aperturas sucesivas. Con todo esto se disminuye la probabilidad de que el canal de calcio se abra. Siguiendo los criterios de la OMS de 1967 se han clasificado en :

2.1) Fármacos que producen un bloqueo selectivo de los canales de tipo L, divididos a su vez en dos subgrupos:

a) 1,4-dihidropiridinas. Tienen acción preferente sobre la musculatura lisa vascular. Entre las más importantes se encuentran nifedipina, nicardipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, etc...

b) Está representado fundamentalmente por el subgrupo de las benzotiazepinas (diltiazem y derivados) y el de las fenilalquilaminas (verapamilo y derivados). Se incluyen fármacos con estructuras químicas complejas, muy heterogéneas y sin relación aparente entre ellas. Tienen una acción más destacada sobre el músculo cardíaco que sobre el músculo liso vascular.

2.2) Fármacos no selectivos, es decir, que a las mismas dosis a las que inhiben el canal de calcio tienen otras acciones farmacológicas. El grupo principal es el de las difenilalquilaminas (piperazinas) donde sus principales representantes son cinarizina, flunarizina, fendilina, prenilamida, etc. Todos ellos actúan predominantemente sobre los vasos sanguíneos aunque con poca selectividad debido a que además de sus propiedades bloqueantes de los canales tipo L, se unen con bastante afinidad al complejo calcio-calmodulina disminuyendo la cantidad de este compuesto disponible para fijarse a la quinasa de la cadena ligera de miosina, paso clave para la contracción de la musculatura vascular.

II.5.- MECANISMO DE ACCIÓN .

Existen al menos tres lugares de fijación para los moduladores de los canales de calcio: dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas. Parece ser que las dihidropiridinas tienen su sitio de unión en la superficie externa, mientras que los de verapamilo y diltiazem se localizan en la superficie citosólica del canal. Esta fijación, en general, es estereoespecífica, saturable y reversible, existiendo correlación entre la capacidad de fijación y la actividad farmacológica en ese tejido. Estos sitios de unión parecen estar muy cerca unos de otros y esto podría dar lugar a interacciones positivas o negativas (Catterall y Striessnig, 1992) Un claro ejemplo de esto es que las 1,4-dihidropiridinas y las benzotiazepinas se favorecen mutuamente la fijación, mientras que las primeras con las fenilalquilaminas son recíprocamente inhibidores (Ramble y Triggle, 1989).

Se ha propuesto que posiblemente las 1,4-dihidropiridinas activadoras e inhibidoras se unan a los mismos sitios de unión comportándose como fármacos competitivos y provocando cambios conformacionales en la estructura del canal. La afinidad de cada uno está modulada por el potencial de membrana (la fijación de las dihidropiridinas presenta una clara dependencia de voltaje. Hille, 1977; Hondeghem y Katzung, 1984; Bolton y cols., 1988). Por

todo esto, la afinidad de las dihidropiridinas antagonistas será mayor cuando el canal esté en estado inactivo, es decir, sus efectos farmacológicos serán mayores en fuertes despolarizaciones, que favorecen el estado inactivado del canal. Las dihidropiridinas no están cargadas al pH fisiológico y se unen al receptor en el CVD-L independientemente del estado en el que se encuentre el canal, si bien su afinidad aumenta cuando está inactivo. Por eso éste bloqueo es poco frecuencia-dependiente.

Para el caso de las fenilalquilaminas se ha propuesto un modelo, que supone que también pueden ocluir mecánicamente el poro del canal, después de fijarse a su dominio (Catterall y Striessnig, 1992).

Diltiazem y verapamilo están ionizados a pH fisiológico, por lo que tienen que atravesar la membrana en su forma no cargada y una vez en el citoplasma la forma cargada alcanza su receptor en el CVD-L preferentemente en estado inactivo. Este bloqueo es frecuencia-dependiente y voltaje-dependiente.

II.6.- SELECTIVIDAD TISULAR .

Los fármacos antagonistas del calcio tienen una buena selectividad tisular sobre el conjunto del sistema cardiovascular, hecho que no elimina los efectos farmacológicos, a veces indeseables, sobre otros tejidos. Dicha selectividad se debe básicamente a que los canales de calcio de tipo L están fundamentalmente localizados en las células lisas vasculares y en las cardíacas. Sabemos que existen otros tipos de canales de calcio en las neuronas, por ejemplo, de los que no hemos hablado y sobre los cuales los antagonistas del calcio son prácticamente inactivos (Llinás y cols., 1989).

Dentro de los bloqueadores a nivel cardiovascular también puede haber diferencias; así por ejemplo verapamilo y diltiazem son más activos sobre el músculo cardíaco, mientras que nifedipino y sus derivados tienen efectos más notables sobre el músculo liso vascular. Esto puede deberse a que los primeros exhiben en sus efectos una clara dependencia de frecuencia de estimulación, a diferencia de lo que ocurre con las dihidropiridinas.

II.7- ACCIONES FARMACOLÓGICAS .

II.7.1.- A NIVEL CARDIOVASCULAR .

Las principales acciones farmacológicas de los antagonistas del Ca^{2+} sobre los vasos y el corazón son: dilatación arterial y arteriolar, acción inotrópica negativa, depresión del automatismo sinusal y de la conducción auriculoventricular (AV).

La acción cardiovascular de los antagonistas del Ca^{2+} se caracteriza por producir unos efectos indirectos por mecanismo reflejo que se oponen a los efectos directos. Está comprobado que los efectos producidos por el bloqueo del flujo de entrada de Ca^{2+} a través de los CVD-L, tales como disminución de la frecuencia y la contractibilidad cardíacas, depresión de la conducción AV y disminución de las resistencias vasculares periféricas y presión arterial, se observan en preparaciones cardíacas y vasculares aisladas, pero no *in vivo*. Esto se debe a que debido a la potente acción vasodilatadora que ejercen, se reduce la presión arterial e inducen por vía refleja la activación de los barorreceptores; que inhiben el tono vagal e incrementa el tono β_1 -adrenérgico cardíaco. Todo esto se traduce en un aumento de la frecuencia y la contractibilidad cardíacas y de la velocidad de conducción AV.

En resumen, *in vivo* los efectos reflejos indirectos enmascaran y contrarrestan los cardiodepresores directos de los antagonistas del Ca^{2+} . Por todo esto el efecto hemodinámico resultante dependerá del antagonista utilizado. Un ejemplo serían las dihidropiridinas que *in vitro* deprimen la frecuencia y contractibilidad cardíacas, pero *in vivo* producen un potente efecto vasodilatador incluso a concentraciones que apenas modifican la actividad cardíaca (predominan los efectos reflejos a concentraciones terapéuticas), por lo que incluso incrementan la frecuencia y contractibilidad del miocardio. Sin embargo verapamilo y diltiazem son menos vasodilatadores, por lo que el efecto reflejo sólo contrarresta parcialmente su acción cardiopresora por lo que a dosis terapéuticas no modifican o deprimen la frecuencia, la contractibilidad y la conducción AV.

Trabajos experimentales (Fleckenstein, 1983) indican que los antagonistas del Ca^{2+} pueden desarrollar una acción cardioprotectora. Cuando se produce una reducción aguda del flujo coronario, disminuyen con rapidez los niveles intracelulares de ATP y se aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} . Esto va a originar un círculo vicioso, al alterarse la integridad del sarcolema aumenta su permeabilidad al Ca^{2+} y aumentan las ATPasas mitocondriales, lo que conduce a una mayor acumulación de Ca^{2+} y disminución de ATP. Todo esto conlleva a una pérdida de la integridad estructural de la membrana y a la muerte celular (infarto). Además, durante la

isquemia aumenta la concentración extracelular de K^+ lo que activa los CDV-L, provocando mayor vasoconstricción que reduce el flujo y aumenta la isquemia miocárdica.

Los antagonistas del Ca^{2+} ejercen su acción cardioprotectora por tres factores principalmente:

- Aumentan el flujo coronario.
- Disminuyen las demandas miocárdicas de O_2 .
- Reducen la entrada de Ca^{2+} por los CVD-L.

Sin embargo no son eficaces en el tratamiento de los reinfartos debido a que existen otros mecanismos por los que penetra el Ca^{2+} a las células.

II.7.1.1.- Acción sobre la fibra lisa vascular:

Aunque existe una cierta participación de las corrientes de Na^+ , la despolarización de las células del músculo liso vascular es insensible a la tetrodotoxina y depende principalmente del movimiento del Ca^{2+} hacia el interior (Bolton, 1979). Además esta contracción vascular está controlada por la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre.

En el músculo liso vascular, el mantenimiento de la respuesta contráctil es debida a dos mecanismos. El primero de ellos, se debe a una despolarización de la membrana que produce la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VOCs). El Ca^{2+} extracelular se desplaza hacia el interior para iniciar el proceso contráctil interaccionando con la proteína reguladora calmodulina. Luego del cierre de los canales del Ca^{2+} se requiere un período finito antes de que puedan abrirse en respuesta a un estímulo. En el segundo mecanismo la contracción está inducida por un agonista y se produce sin despolarización de la membrana (ROC). Es el resultado de la hidrólisis del fosfatidilinositol presente en la membrana con formación de trifosfatos de inositol que actúan como segundos mensajeros liberando Ca^{2+} intracelular del retículo sarcoplásmico (Berridge, 1987). Esta liberación mediada por receptores del Ca^{2+} intracelular puede desencadenar el ingreso del Ca^{2+} extracelular. Los antagonistas de los canales de Ca^{2+} van a inhibir los canales voltaje dependientes a concentraciones significativamente menores que las requeridas para interferir en la liberación de Ca^{2+} intracelular o para bloquear los canales operados por receptor.

Un aumento del Ca^{2+} citosólico produce una mayor fijación de este ion a la proteína calmodulina. El complejo Ca^{2+} -calmodulina a su vez activa la quinasa de la miosina de la cadena liviana, con la consiguiente fosforilización

de dicha cadena. Esta fosforilización promueve la interacción entre actina y miosina y el mantenimiento de la contracción del músculo liso.

Los antagonistas del Ca^{2+} producen una potente acción vasodilatadora arterial con un alto grado de selectividad. Esta selectividad se debe a que el flujo de entrada de Ca^{2+} a través de los CVD-L y la liberación del Ca^{2+} intracelular varía incluso dentro del mismo territorio cardiovascular. En un lecho en el que el tono vascular dependa fundamentalmente de la entrada de Ca^{2+} producirán una potente vasodilatación, mientras que su efecto será menor si depende de la liberación de Ca^{2+} intracelular.

En las arterias, las contracciones inducidas por despolarización (neurógena o K^+) son suprimidas al retirar el Ca^{2+} del medio o al añadir antagonistas del Ca^{2+} , eso indica que se deben casi exclusivamente a la entrada de Ca^{2+} a través de los CDV-L; sin embargo, las contracciones inducidas por agonistas se deben a la movilización de Ca^{2+} intracelular y como los antagonistas del Ca^{2+} no inhiben esa movilización, no podrán inhibir las respuestas vasoconstrictoras de esos agentes.

Por lo general, los vasos de resistencia son más sensibles a los bloqueadores de los canales de calcio que los vasos de capacitancia; es decir, producen vasodilatación predominantemente arteriolar. Por tanto el retorno

venoso y la precarga se ven poco afectados por estos fármacos, pero hay una importante reducción de la resistencia vascular periférica, de la poscarga cardíaca y de la presión arterial sistémica.

En la circulación coronaria los antagonistas del Ca^{2+} provocan una relajación, tanto de las arterias conductoras como de las arterias colaterales y las arteriolas precapilares. Esto provoca una reducción de la resistencia vascular coronaria total y un aumento del flujo sanguíneo coronario, tanto para las regiones normalmente vascularizadas como para los territorios isquémicos. Este efecto a nivel coronario observado con otros vasodilatadores (nitroglicerina) no lo presentan los bloqueantes de los canales de calcio. Además el efecto dilatador coronario persiste en vasos con lesiones ateroscleróticas, o que presentan trastornos vasoespásticos funcionales, como ocurre en la angina de Prinzmetal.

II.7.1.2.- Efectos electrofisiológicos.

Los antagonistas del Ca^{2+} a concentraciones terapéuticas no alteran la corriente rápida de Na^+ , por lo que no modifican la velocidad de conducción ni el período refractario auricular, ventricular o del sistema His-Purkinje. Por el contrario, deprimen los nodos SA y AV, estructuras cuya despolarización

depende de la entrada de Ca^{2+} , si bien los cambios producidos dependen del fármaco utilizado.

Verapamilo y diltiazem no alteran la frecuencia sinusal, pero a dosis elevadas pueden provocar bradicardia y asistolia.

Las dihidropiridinas al incrementar por vía refleja el tono simpático cardíaco, no deprimen o incluso aumentan la frecuencia sinusal y la conducción AV, careciendo de las propiedades antiarrítmicas de verapamilo y diltiazem.

II.7.2.- A NIVEL RENAL .

Cuando las resistencias renales aumentan, los antagonistas del Ca^{2+} van a provocar un aumento de la filtración glomerular y del flujo renal. De forma selectiva el aumento en la filtración glomerular es mayor que el del flujo renal. Además producen un efecto diurético y natriurético, que unido al hecho de que no incrementan el tono simpático ni la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, explica que en el tratamiento crónico no produzcan retención hidrosalina ni aumento de peso (a diferencia de otros

vasodilatadores). Este efecto natriurético se debe primero a un efecto renal directo que suprime la reabsorción de Na^+ en el túbulo proximal de la nefrona, y segundo por la inhibición del tono simpático renal.

II.7.3.- A NIVEL METÁBOLICO.

II.7.3.1.- Metabolismo glucídico.

La secreción de insulina es dependiente de la acumulación intracelular de calcio, mediada a través de canales y estudios realizados con animales muestran que estos agentes reducen la secreción de insulina. En estudios humanos, dosis terapéuticas de verapamilo, diltiazem y nifedipino sin embargo no han mostrado efectos significativos sobre los niveles postprandiales de glucosa (Tuck, 1988), lo cual supone una ventaja para el tratamiento de la hipertensión en personas diabéticas.

De esta forma los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tienen varias ventajas potenciales como primera línea terapéutica en la hipertensión diabética, ya que como ellos no perjudican la actividad del sistema nervioso central o periférico no son causa de retención de sodio, no agravan los

desórdenes vasculares y potencialmente tienen mínimos efectos sobre la función sexual.

II.7.3.2.- Metabolismo lipídico.

Estudios clínicos recientes indican que los antagonistas de los canales de Ca^{2+} son eficaces en el control de las lesiones producidas en los procesos ateroscleróticos.

Los antagonistas del Ca^{2+} son uno de los grupos de primera línea entre los fármacos antihipertensivos, pero su estudio sigue siendo muy interesante por la posibilidad de incrementar sus acciones terapéuticas. Dos de los principales resultados observados clínicamente y experimentalmente de los efectos antiescleróticos de los antagonistas del Ca^{2+} están relacionados con sus efectos sobre los canales de calcio voltaje dependientes y sobre lugares de acción no relacionados. La calcificación de la placa aterosclerótica y la calcificación arterial durante la hipertensión, así como los desórdenes clínicos y experimentales que sufre el metabolismo de la vitamina D, paratiroides y calcitonina, centran directamente la atención hacia el papel del calcio en los procesos ateroscleróticos (Fleckenstein y cols., 1990; Knorr y cols., 1990).

En las pruebas internacionales de nifedipina sobre la terapia antiaterosclerótica (INTAC) reportaron importantes datos. Se llevó a cabo un ensayo multicéntrico, randomizado, doble-ciego estudiando al menos 282 pacientes. Después de 80 mg diarios de nifedipina no hubo cambios en la progresión de las lesiones existentes, pero hubo una reducción significativa en la formación de nuevas lesiones (Lichtlen y cols., 1990; Waters y cols., 1990).

Los datos clínicos disponibles indican claramente que los antagonistas del Ca^{2+} , al menos los derivados de la 1,4-dihidropiridina son agentes antiateroscleróticos efectivos en los estados tempranos de las lesiones. Son necesarios estudios más extensos para determinar el verdadero impacto clínico de estas observaciones, así como también es necesario definir el principal mecanismo de esta acción. A pesar de las limitaciones de los modelos experimentales actuales, y de acuerdo con los datos clínicos disponibles, los primeros estadios de la aterosclerosis son los más afectados. Muchos de estos procesos de aterosclerosis son sensibles solo a altas concentraciones de estos agentes. Sin embargo procesos como la migración celular muscular, el crecimiento de los factores de activación, que aparecen de forma temprana son sensibles a dosis clínicas. Además, es posible que el tratamiento crónico con antagonistas del calcio a dosis clínicas sirviera para regular situaciones que actualmente son insensibles o débilmente sensibles al tratamiento agudo con estos agentes.

La hidrólisis de los ésteres de colesterol es sensible *in vivo* al tratamiento crónico con antagonistas del Ca^{2+} (Ettingin y cols., 1990) y la regulación y co-regulación de los canales de calcio y sus efectos asociados están bien establecidos (Ferrante y cols., 1990).

Definir los mecanismos básicos de acción de los antagonistas del Ca^{2+} es crítico, ya que esto indicaría si la arterosclerosis y las actividades de los canales de Ca^{2+} están ligadas en estos procesos. En la actualidad no existen evidencias que permitan hacer esta distinción. Es importante que se defina de forma exacta, ya que permitiría determinar la ruta de estos agentes y ser más efectivos en el tratamiento de la aterosclerosis.

II.7.4.- OTRAS ACCIONES .

Al evitar el acoplamiento excitación-contracción, los antagonistas del calcio producen un efecto espasmolítico generalizado sobre la musculatura lisa a nivel digestivo, bronquial, biliar, uretral y uterino.

Además de su interacción de alta afinidad con los receptores específicos de los canales L de Ca^{2+} , estos fármacos forman uniones de baja afinidad con otras estructuras, tales como canales de Na^+ (verapamilo), los receptores α -adrenérgicos, serotoninérgicos, opiáceos y colinérgicos (verapamilo y diltiazem), los receptores benzodiazepínicos periféricos (dihidropiridinas), la glicoproteína P de la membrana celular y, también, con sitios receptores de la membrana mitocondrial.

Con las dosis clínicas habituales, la interacción de los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} con estas estructuras poco o nada contribuyen a la producción de efectos específicos. Sin embargo podría existir un potencial terapéutico para alguna de esas interacciones de baja afinidad, especialmente en el caso de la glicoproteína G_p , responsable de la resistencia a determinados fármacos anticancerígenos (Zerning, 1990).

También *in vitro* inhiben la agregación plaquetaria; sin embargo las plaquetas carecen de CDV-L, por lo que su acción no se debería al bloqueo en la entrada de Ca^{2+} , sino a una acción intracelular. Parece ser que *in vivo* potencian la acción antiagregante del ácido acetilsalicílico y de dipyridamol, pero se desconoce su mecanismo.

II.7.4.1.- Acción broncodilatadora.

En estudios realizados por Fanta y cols. (1982) se usó nifedipina en broncoconstricción inducida por el ejercicio. Se inhibió el tono intrínseco de los anillos traqueales, así como la contracción inducida por histamina y carbacol. El resultado de estos estudios indicó que la nifedipina inhibía la constricción inducida por mediadores (Fanta y cols., 1982)

Himori y Taira (1980) estudiaron los efectos de nifedipino y verapamilo a nivel de músculo y vasos traqueales de ocho perros anestesiados. Encontraron que nifedipina producía dilatación y vasodilatación traqueal, siendo más potentes los efectos en vasos que en la musculatura lisa no vascular. Los resultados con verapamilo fueron similares pero veinte veces menos potentes.

Se han realizado estudios clínicos en los que se demuestra la efectividad de los antagonistas del calcio en el tratamiento del asma inducido por el ejercicio (Crimi y cols.,1984; Sharma y cols., 1986; Patel y cols., 1988; Rafferty y cols., 1987; Foresi y cols.,1987). Nifedipino aparece como uno de los antagonistas del calcio más efectivos en la prevención del asma inducido por el ejercicio (Sharma y cols., 1986).

II.7.4.2.- Acción citoprotectora.

El aumento patológico del Ca^{2+} intracelular es una de las causas que originan la necrosis celular por lo que parece lógico que se estudien estos fármacos en busca de una acción citoprotectora. Los órganos en los que se ha estudiado esta acción con más intensidad han sido corazón y cerebro (Lancefield, 1989).

En este punto es fundamental referirnos a la homeostasis neuronal del Ca^{2+} . Existe una evidencia creciente de que el envejecimiento de las neuronas está causado por una alteración en la distribución de las concentraciones de Ca^{2+} , la cual normalmente permanece constante. La habilidad de la neurona para controlar y regular la homeostasis del calcio gradualmente se deteriora en el proceso de envejecimiento. Al mismo tiempo, la actividad de las proteínas dependientes del Ca^{2+} como la calmodulina parece declinar con la edad. En la demencia del tipo Alzheimer, factores exógenos como virus, agentes tóxicos, efectos endocrinos, así como sustancias exógenas (p. ej. s. amiloide), aceleran gravemente el mecanismo de deterioro de los mecanismos reguladores del Ca^{2+} neuronal, debidos a las intensas perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} (Fischhof, 1989).

II.8.- REACCIONES ADVERSAS E INTERACCIONES.

II.8.1.- REACCIONES ADVERSAS.

Los efectos secundarios más comunes causados por los antagonistas del Ca^{2+} , principalmente los derivados de la dihidropiridina, se deben a una vasodilatación excesiva. Esto puede manifestarse por mareos, hipotensión, cefalea, rubor, disestesia digital y náuseas. Además los pacientes pueden presentar edema periférico, tos, sibilancias y edema pulmonar. Las erupciones cutáneas y la somnolencia son menos comunes. En general estos efectos secundarios son benignos y desaparecen con el tiempo o ajustando la dosis.

También se ha observado agravamiento de la isquemia de miocardio causada por una hipotensión excesiva, o un aumento de la demanda de O_2 por una taquicardia excesiva. Diltiazem y verapamilo tienen menos riesgo de provocar un agravamiento de la isquemia ya que su capacidad para inducir dilatación arteriolar periférica y taquicardia es menor.

Se han registrado casos de bradicardia, asistolia transitoria y exacerbación de la insuficiencia cardíaca, si bien estas respuestas se dan usualmente al administrar de forma intravenosa verapamilo en pacientes con

enfermedad de nódulo SA, alteraciones en la conducción nodal o en presencia de bloqueo β -adrenérgico. Cuando se administra por vía intravenosa verapamilo a pacientes con el síndrome de Wolff-Parkinson-White o fibrilación auricular, aumenta la frecuencia ventricular. Esto se debe al aumento reflejo en la actividad nerviosa simpática (Gulamhusein y cols., 1982). También causa hipotensión o fibrilación ventricular graves en pacientes con taquicardia ventricular (Rankin y cols., 1897).

También verapamilo y diltiazem pueden originar efectos adversos gastrointestinales siendo el más frecuente la constipación, pudiendo darse otros síntomas gastrointestinales más altos. El mejor tolerado es diltiazem.

II.8.2.- INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.

Las interacciones de interés clínico, en que están implicados los bloqueantes de los canales de calcio pueden tener lugar a nivel farmacocinético o farmacodinámico.

Interacciones farmacocinéticas: Verapamilo y diltiazem aumentan la concentración plasmática de digoxina, por reducir la depuración renal y su volumen de distribución; si bien rara vez se desarrolla una acción tóxica debida

a el glucósido (Schwartz y cols., 1982). Por ello está contraindicado el uso de verapamilo para tratar la toxicidad de la digital.

Existen algunos antagonistas de los receptores H_2 , como cimetidina, que reducen el metabolismo hepático de diversos medicamentos, incluyendo los antagonistas del Ca^{2+} , determinando un aumento en la biodisponibilidad oral de verapamilo y diltiazem.

Interacciones farmacodinámicas: Los bloqueantes β -adrenérgicos se asocian frecuentemente con los antagonistas del Ca^{2+} en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la angina de esfuerzo. Actúan sinérgicamente como inhibidores del automatismo sinusal, de la conducción auriculoventricular y del inotropismo cardíaco. Consecuentemente, en pacientes con tratamiento con β -bloqueantes está contraindicada la inyección intravenosa de verapamilo o diltiazem y se recomienda precaución en su administración oral para evitarse un bloqueo AV, una inhibición sinusal y/o una depresión de la función ventricular. La asociación de nifedipina con β -bloqueantes es frecuente y no implica riesgos en los pacientes con función ventricular normal.

El efecto hipotensor de quinidina y el efecto inotrópico negativo de quinidina y disopiramida está potenciado por verapamilo y diltiazem. Se ha

mencionado también la hipotensión arterial como consecuencia de la asociación de nitrodilatadores y diltiazem.

II.9.- INDICACIONES TERAPÉUTICAS.

Los usos clínicos de los antagonistas del Ca^{2+} han sido objeto de gran número de reuniones y simposios (1987a, 1987b, 1987c).

La alteración en el transporte u homeostasis del calcio por parte de los fármacos antagonistas de los canales de calcio, modulando su movimiento a través de los canales voltaje-dependientes, que sólo existen en la membrana de determinadas células, pone de manifiesto que sólo debido a su limitada selectividad tisular van a ver reducidas sus múltiples indicaciones terapéuticas. Por todo esto pueden tener aplicación en multitud de procesos patológicos, principalmente cardiovasculares y también no cardiovasculares tales como la acalasia esofágica (incapacidad de los músculos esofágicos para relajarse), el asma bronquial, la depresión, la enfermedad del Parkinson, ataques convulsivos, cefaleas, parto prematuro, etc... (Janis. 1987; Gandía.1990).

ANGINA DE PECHO .

Podemos diferenciar tres tipos de angina sobre los que actúan los antagonistas del calcio:

Angina variante: Se debe a una reducción en el flujo, no a un aumento de la demanda de oxígeno. La protección en este tipo de angina se debe a la vasodilatación coronaria y no a alteraciones en la hemodinámica periférica (Waters y cols., 1981). En un ensayo multicéntrico, nifedipina eliminó ataques de angina variante en un 63% de los pacientes. (Antman y cols., 1980). Nicardipina y diltiazem también son efectivos. verapamilo en algunas publicaciones, aparece como igualmente efectivo (Severi y cols., 1980) aunque en otras aparece como menos efectivo que nifedipina (Kimura y Kishida, 1981).

En la angina variante de Prinzmetal, el dolor precordial ocurre característicamente en reposo o durante el sueño despierto al paciente. Puede acompañarse de palpitaciones o disnea grave, también puede ser de comienzo muy rápido, grave y con sensación de miedo. Puede provocarse por un esfuerzo, pero la cantidad de ejercicio con el cual se produce suele ser muy variable. La angina variante se debe a espasmo localizado en una arteria coronaria epicárdica proximal; en cerca de las tres cuartas partes de los pacientes existe obstrucción aterosclerótica en una arteria coronaria y suele ocurrir un espasmo cerca de la lesión estenótica (Selwyn y Braunwald, 1989).

Angina inducida por el esfuerzo: La utilidad de estos bloqueadores puede deberse a un aumento del flujo sanguíneo causado por vasodilatación arterial coronaria o a una disminución de la demanda de oxígeno por el miocardio secundaria a una disminución de la presión arterial, frecuencia cardíaca o contractibilidad.

En algunos pacientes, las dihidropiridinas agravan los síntomas anginosos. Esto puede deberse al aumento del tono simpático secundario a la vasodilatación periférica, y/o a una disminución pronunciada en la presión de perfusión coronaria o robo coronario. Este efecto adverso no es tan prominente con verapamilo o diltiazem. En el tratamiento de la angina inducida por el ejercicio la terapia concurrente con nifedipina y propanolol ha demostrado ser más efectiva que cualquier otro agente por separado, posiblemente debido a que el antagonista β -adrenérgico suprime la taquicardia refleja (Bassan y cols., 1982).

Angina inestable: Aunque se la conoce como angina preinfarto o creciente se define mejor como angina recurrente asociada con un ejercicio mínimo. Es prolongada y frecuente, el flujo coronario está bastante limitado y se pueden producir incluso vasoespasmos (Hugenholtz y cols., 1981). Los antagonistas del Ca^{2+} ofrecen un enfoque particular del tratamiento de este tipo de angina, siendo especialmente efectivos si se da el vasoespasmo. Sin

embargo las evidencias aún no son suficientes para saber si disminuyen la mortalidad.

ARRITMIAS .

Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} constituyen uno de los grupos de fármacos antiarrítmicos. Su acción se basa en la depresión de los potenciales de acción dependientes del Ca^{2+} y la reducción de la conducción en el nódulo AV. En la actualidad el único bloqueador de los canales del Ca^{2+} que se comercializa como antiarrítmico es verapamilo. Diltiazem todavía se está evaluando.

Verapamilo se ha convertido en el agente de elección para eliminar los episodios de taquicardia supraventricular paroxística. También es muy útil para la reducción inmediata de la respuesta ventricular a la fibrilación o aleteo auricular a menos que la arritmia esté asociada con el síndrome de Wolff-Parkinson-White.

HIPERTENSIÓN .

Constituyen un grupo muy importante en el tratamiento de la hipertensión. Este efecto fue demostrado hace más de 20 años, pero no se evaluaron rigurosamente hasta la última década. Todos los bloqueadores de los canales del Ca^{2+} disminuyen la tensión arterial por relajación del músculo

liso arteriolar y disminución de la resistencia vascular periférica (Lehmann y cols., 1983), lo cual justifica el uso de estos agentes ya que la hipertensión fija se debe a un aumento de la resistencia vascular. Además, a diferencia de otros dilatadores arteriulares, estos fármacos no causan retención hídrica y sólo las dihidropiridinas producen una taquicardia refleja leve y moderada (Frishman y cols., 1987).

Todos los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} son igualmente efectivos cuando se usan solos para el tratamiento de la hipertensión leve o moderada, siendo tan efectivos como los antagonistas β -adrenérgicos o los diuréticos (Doyle, 1983; Inouye y cols., 1984).

Estos fármacos son agentes versátiles con probada eficacia en todo tipo de pacientes (Kiowski y cols., 1986). Son especialmente útiles en la hipertensión con renina baja (p. ej., negros y ancianos). Su eficacia aumenta al usarlos de forma concomitante con un antagonista β -adrenérgico, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina o metildopa.

De forma general, los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} son seguros y efectivos para el tratamiento de la hipertensión. No deben ser usados en pacientes con anomalías nodales SA o AV o en aquellos casos con

insuficiencia cardíaca congestiva manifiesta. Son seguros en pacientes hipertensos con asma, hiperlipidemia, diabetes melitus y disfunción renal.

MIGRAÑA .

En este grupo de fármacos, se encuentran varios agentes que mostraron resultados prometedores en el tratamiento profiláctico de la migraña y un síndrome relacionado conocido como cefalea acuminada (Greenberg, 1986; Olesen, 1986; Spierings, 1986). Los agentes más recientes, como flunarizina y nimodipina, parecen ser más útiles que verapamilo y nifedipina. De ellos, flunarizina ha sido la más evaluada consiguiendo una reducción de hasta el 90% en la frecuencia de la migraña clásica o la común. También puede ser efectiva en la migraña hemipléjica de la niñez (Caers y cols., 1987). Es de interés que para que se manifiesten los efectos máximos se requieran de 1 a 2 meses de tratamiento.

PARTO PREMATURO .

Se sabe que los antagonistas del Ca^{2+} relajan *in vitro* el miometrio e inhiben de forma pronunciada la amplitud (no la frecuencia) de las contracciones inducidas por oxitocina. Sin embargo las observaciones en animales de experimentación sugieren que pueden reducir la perfusión placentaria hasta el grado de producir hipoxemia fetal y acidosis (Ducsay y cols., 1987; Holbrook y cols., 1987).

II.10.- CONTRAINDICACIONES.

El empleo de verapamilo y diltiazem está contraindicado en pacientes con hipotensión arterial moderada o grave, insuficiencia cardiaca grave, síndrome del seno enfermo, bloqueo AV de 2º ó 3º grado, fibrilación auricular, síndrome de Wolff-Parkinson-White o taquicardia ventricular (McGovern y cols.,1986). Se debe de tener en cuenta la asociación con otros agentes que pueden dar lugar a interacciones con riesgo para el paciente. Así, por ejemplo está contraindicado el uso concomitante de verapamilo intravenoso con antagonistas β -adrenérgico ya que aumentaría la propensión a un bloqueo auriculoventricular y/o depresión de la función ventricular.

Las contraindicaciones del nifedipino incluyen, además de la hipotensión arterial preexistente, la estenosis aórtica y la cardiomiopatía hipertrófica obstructiva, situaciones en las cuales la disminución de la poscarga cardíaca aumenta el gradiente de presión a través de la válvula aórtica, con un agravamiento del cuadro clínico. No obstante el verapamilo y el diltiazem se han usado con éxito en la cardiomiopatía hipertrófica.

PARTE

EXPERIMENTAL

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

III.1.-CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO.

III.1.1.- Animales de experimentación.

Para el desarrollo de las experiencias se han utilizado animales suministrados por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de Sevilla, seleccionándose ratas albinas machos de raza Wistar de 300-400 g de peso y cobayas albinos Dunkin-Hartley, de ambos sexos con un peso medio de 300-400 g .

Los animales se han mantenido en jaulas con lecho de viruta, alimentándolos con una dieta de piensos especial para animales de laboratorio (Panlab), con un consumo variable en función del peso y edad del animal; agua *ad libitum* y temperatura constante de 20-24 °C (Consejo de las Comunidades Europeas, 1986).

III.1.2.- Fármacos ensayados y preparación de soluciones.

A lo largo de los distintos ensayos experimentales hemos utilizado: tetrazepam (Sanofi Winthrop, S.A, Barcelona), diltiazem (Sigma), teofilina (Sigma), atropina (Sigma), carbacol clorhidrato (Sigma), EDTA (Sigma), y PK 11195 (Sigma).

Las soluciones de tetrazepam se prepararon disolviendo inicialmente el fármaco en 3 mL de DMSO con posterior adición de alcohol absoluto, hasta conseguir una solución stock de 3×10^{-2} M. Las concentraciones ensayadas de tetrazepam, preparadas a partir de la solución stock, fueron elegidas dentro de un rango micromolar que corresponden al extrapolarlas con las concentraciones plasmáticas habituales de benzodiazepinas utilizadas en clínica humana (3×10^{-7} M- 10^{-5} M) (Zbinden y Randall 1967).

Las soluciones de teofilina se prepararon usando NaOH (0.5M) y NaCl (0.9g/100mL) a partes iguales según el procedimiento descrito por Nielsen-Kudsk y cols (1986).

Con los restantes fármacos se prepararon soluciones stock de 10^{-2} M en agua destilada, a partir de las cuales se obtuvieron diariamente las distintas soluciones a utilizar.

Se han realizado las correspondientes curvas controles con los diferentes disolventes en los cuales se han vehiculizado los distintos principios activos, con el fin de ver la influencia del disolvente en la respuesta.

Los líquidos nutritivos empleados en las distintas experiencias fueron:

-Solución Krebs-Bicarbonato (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, MgSO₄·7H₂O 1.10, KH₂PO₄ 1.0, Glucosa 11 .

-Solución Tyrode (mM): NaCl 139.2, KCl 2.68, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 11.9, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.4 y Glucosa 5.5 .

-Solución Tyrode libre de calcio (mM): NaCl 139.2, KCl 2.68, NaHCO₃ 11.9, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.4 y Glucosa 5.5 .

-Solución Tyrode libre de calcio + EDTA (mM): NaCl 139.2, KCl 2.68, NaHCO₃ 11.9, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.4, EDTA 0.1 y Glucosa 5.5 .

-Solución Tyrode enriquecida en K⁺ (mM): NaCl 139.2, KCl 30, NaHCO₃ 11.9, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.4 y Glucosa 5.5 .

III.1.3.- Expresión de resultados.

Con los resultados obtenidos mediante la aplicación de los distintos protocolos experimentales, se construyen las correspondientes curvas dosis-respuesta. Las representaciones gráficas se realizan situando en ordenadas los % de efectos calculados y en abscisas los logaritmos de las concentraciones molares de las dosis ensayadas. Esto permite calcular el valor de la concentración molar que produce el 50% de efecto máximo, es decir, "concentración inhibitoria 50" (IC_{50}) y el valor del logaritmo negativo de dicha concentración (pD_2), según el método descrito por Van Rossum (1963).

III.1.4.- Análisis estadístico.

Las curvas dosis-efecto fueron analizadas en un rango entre 20-80% de la respuesta contráctil máxima para determinar la IC_{50} usando un análisis de regresión lineal. Los resultados son expresados como media \pm SEM.

La relación entre los valores experimentales y los valores controles se consideró significativa desde $p < 0.05$. El análisis estadístico del efecto de tetrazepam, diltiazem y teofilina sobre las contracciones inducidas por Cl_2Ca , se realizó por el procedimiento de la "t" de Student

III.2.- TRÁQUEA AISLADA DE RATA Y COBAYA.

III.2.1.- Descripción de la técnica.

Se emplean ratas Wistar de un peso medio de 300-450 g, o bien cobayas Dunkin-Hartley de 300-400 g.

Se sacrifica el animal mediante un golpe en la nuca y se realiza una incisión a nivel del cuello con exanguinación total, esta operación debe realizarse minuciosamente para no deteriorar la zona anatómica de estudio. Posteriormente se separan los planos musculares y se extrae la tráquea, la cual se mantiene en solución nutritiva Krebs-bicarbonato con oxigenación constante.

Una vez aislado el órgano se separa minuciosamente el tejido adherente y conectivo, cortando a continuación dos secciones iguales de unos 3 mm cada una. Los anillos traqueales así obtenidos se suspenden entre dos ganchos de acero, uno de los cuales se ata a una varilla metálica que se introduce en el baño de órganos mientras que el otro gancho se encuentra unido a un transductor isométrico *Harvard* acoplado a un equipo registrador *Omniscribe*. El órgano se somete a una tensión inicial de 2 g, permaneciendo

el baño termostático a una temperatura de 37 °C y con oxigenación constante de carbógeno durante toda la experiencia.

III.3.-CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCl (120mM).

III.3.1.- Desarrollo de la experiencia.

Una vez efectuado el montaje, se deja estabilizar la tráquea aislada durante 60 min. sometida a 2 g de tensión, con renovación del Krebs cada 15 min. A continuación se adiciona KCl (120mM) lográndose una contracción mantenida en forma de meseta. Al estabilizarse dicha contracción, se añaden dosis acumulativas de tetrazepam (10^{-7} - 3×10^{-4} M), diltiazem (3×10^{-10} - 3×10^{-7} M) y teofilina (10^{-6} - 10^{-2} M) con un periodo entre dosis de 15 min.

De la misma forma y siguiendo un protocolo semejante al anterior, se llevaron a cabo experiencias en presencia de atropina (10^{-6} M).

III.3.2.- Resultados.

Los resultados obtenidos sobre contracciones inducidas en anillos traqueales de rata por KCl (120mM), en ausencia y presencia de atropina (10^{-6} M) , de los distintos fármacos ensayados: tetrazepam (10^{-7} - 3×10^{-4} M), diltiazem (3×10^{-10} - 3×10^{-7} M) y teofilina (10^{-6} - 10^{-2} M) quedan recogidos en la figura 3 .

En dicha gráfica podemos apreciar que la relajación obtenida con dichos fármacos es siempre dosis-dependiente consiguiéndose en todos los casos la relajación total de la tráquea aislada de rata.

Estos resultados no se ven modificados cuando la experiencia fue realizada en presencia de atropina (10^{-6} M, dosis suficiente para bloquear el receptor muscarínico).

El rango de potencia observado en las curvas fue el siguiente:
diltiazem > tetrazepam > teofilina.

Los valores de IC_{50} para las distintas sustancias ensayadas quedan recogidos en la tabla I.

Contracción inducida por KCl (120 mM)
en traquea de rata.

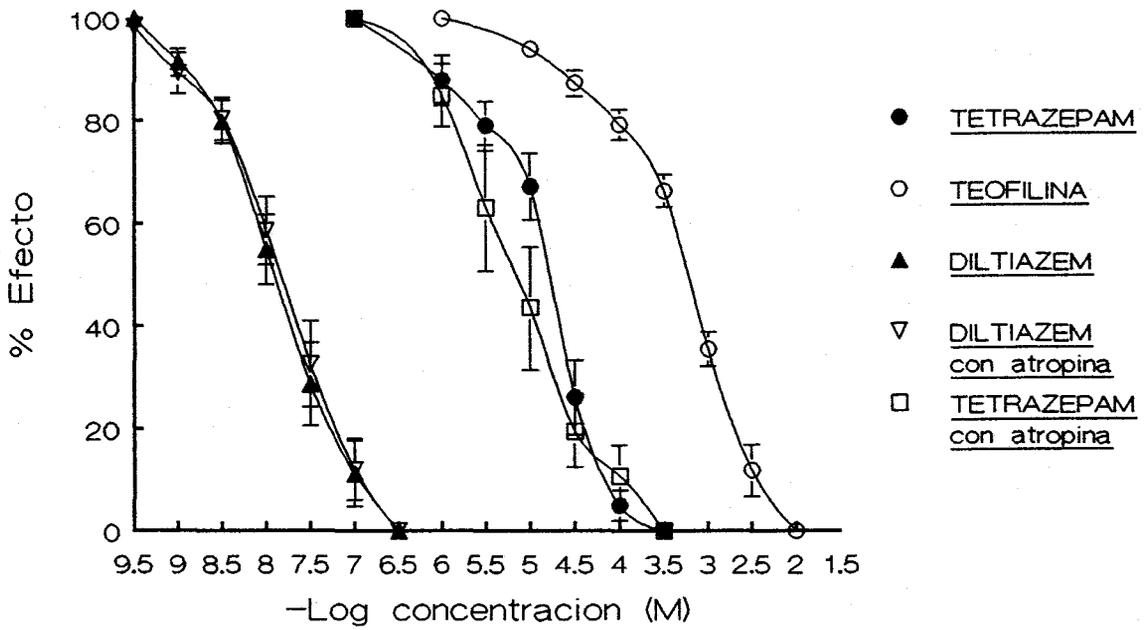


Figura 3

III.4.- CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CARBACOL.

III.4.1.- Desarrollo de la experiencia.

Se mantiene el órgano aislado en solución Krebs-bicarbonato durante 60 min con una tensión de 2 g. A continuación se adiciona una sola dosis de carbacol para obtener en baño una concentración de $0.5 \times 10^{-6} \text{M}$, lo cual origina una contracción submaximal mantenida en meseta. Una vez estabilizada ésta, se van adicionando los fármacos de forma acumulativa.

Las concentraciones ensayadas de cada fármaco se encuentran entre los siguientes rangos: tetrazepam (10^{-7} - 10^{-4}M), diltiazem (3×10^{-9} - 10^{-5}M) y teofilina (10^{-7} - 10^{-3}M). Las distintas dosis se adicionan al baño con un intervalo de 15 minutos entre ellas.

La experiencia la repetimos bloqueando previamente los receptores benzodiazepínicos periféricos con PK 11195 (10^{-6}M) (Le Fur et al 1983), adicionando posteriormente tetrazepam.

Se realizaron experiencias con carbacol adicionándolo de forma acumulativa, en ausencia y presencia de los distintos fármacos, con objeto de analizar el tipo de antagonismo obteniéndose curvas controles que se comparan con las obtenidas incubando previamente con cada fármaco durante 15 min. Las dosis ensayadas fueron: tetrazepam (10^{-6} y 10^{-5} M), diltiazem (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) y teofilina (10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M).

III.4.2.- Resultados.

En la figura 4 quedan recogidas las curvas dosis-respuestas obtenidas tras la administración de tetrazepam (10^{-7} y 10^{-4} M), diltiazem (3×10^{-9} - 10^{-5} M) y teofilina (10^{-7} - 10^{-3} M) frente a contracciones inducidas por carbacol (0.5×10^{-6} M).

En dicha gráfica podemos apreciar que la relajación obtenida con dichos fármacos es siempre dosis-dependiente consiguiéndose en todos los casos la relajación total de la tráquea aislada de rata.

Los resultados obtenidos con tetrazepam no se ven modificados cuando la experiencia fue realizada en presencia de PK 11195 (10^{-6} M).

El rango de potencia observado en las curvas fue el siguiente:
diltiazem>tetrazepam>teofilina .

Los valores de IC_{50} obtenidos para los distintos fármacos ensayados quedan recogidos en la tabla I.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas con carbacol, cuando las sustancias de estudio fueron adicionadas previamente quedan reflejadas en las figuras 5, 6 y 7. El efecto inhibitorio del tetrazepam se comienza a observar con las dosis de $10^{-5}M$. (figura 5). En cambio para diltiazem, desde la primera dosis ensayada ($10^{-7}M$) es posible obtener un desplazamiento de las curvas dosis-efecto hacia la derecha con disminución del efecto máximo de las mismas (figura 6). Cuando la experiencia se realiza con teofilina, ninguna de las dosis ensayadas es capaz de inhibir significativamente dicha contracción (figura 7).

Los parámetros de las curvas dosis-respuesta están recogidos en la tabla II.

**Contracción inducida por carbacol
en traquea de rata.**

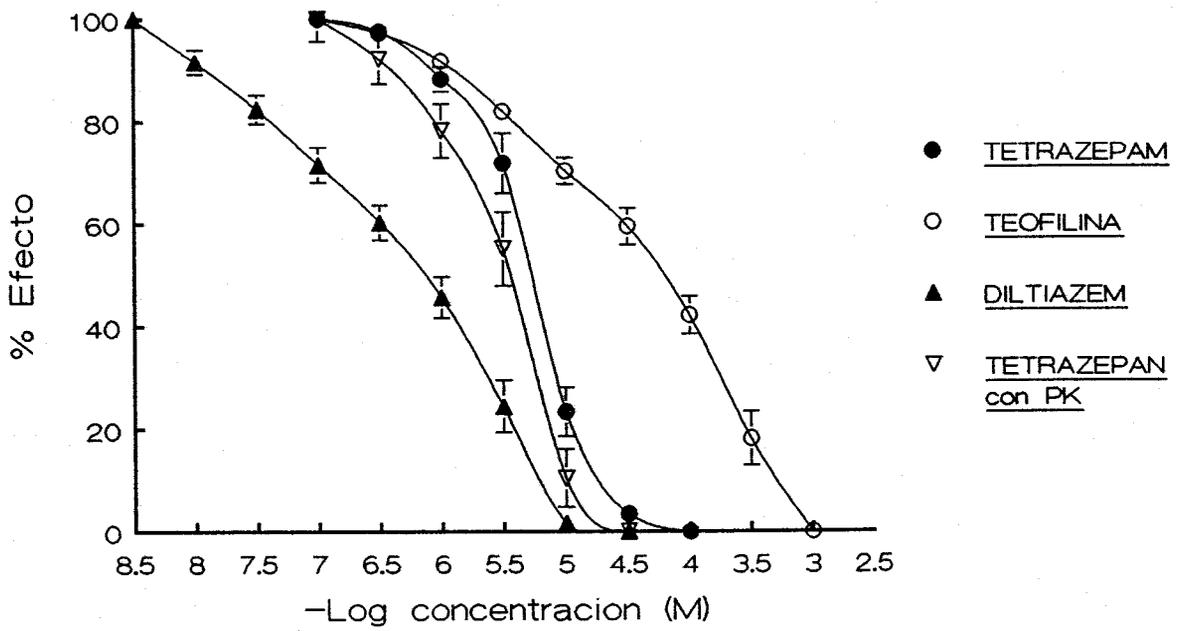


Figura 4

	KCl (120 mM)	CCh (0.5 x 10 ⁻⁶ M)
TETRAZEPAM	1.31 ± 0.31x10 ⁻⁵	4.93 ± 0.47x10 ⁻⁶
TETRAZEPAM + atropina (10⁻⁶ M)	1.01 ± 0.42 x10 ⁻⁵	-
TETRAZEPAM + PK 11195 (10⁻⁶ M)	-	3.41 ± 0.78x10 ⁻⁷
DILTIAZEM	1.74±0.61x10 ⁻⁸	6.79±1.88x10 ⁻⁷
DILTIAZEM + atopina (10⁻⁶ M)	2.80±0.82x10 ⁻⁸	-
TEOFILINA	5.34±0.57x10 ⁻⁴	5.29±0.89x10 ⁻⁵

Valores de IC₅₀ (M) de tetrazepam, diltiazem y teofilina obtenidos en tráquea aislada de rata

TABLA I

**Contraccion inducida por carbacol
en traquea de rata.**

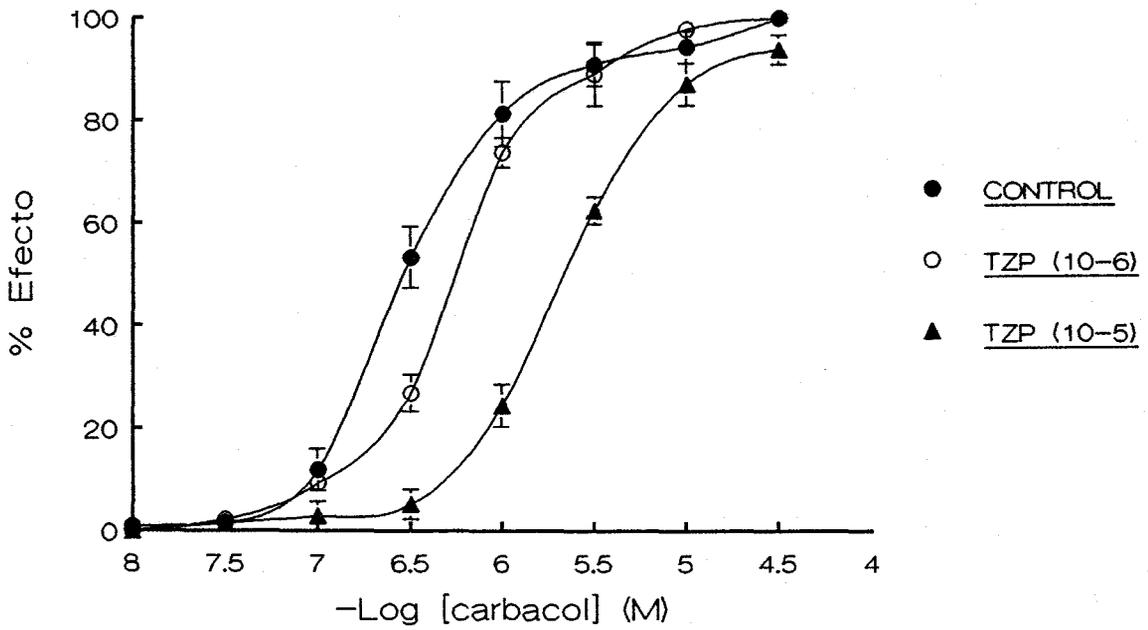


Figura 5

**Contracción inducida por carbacol
en traquea de rata.**

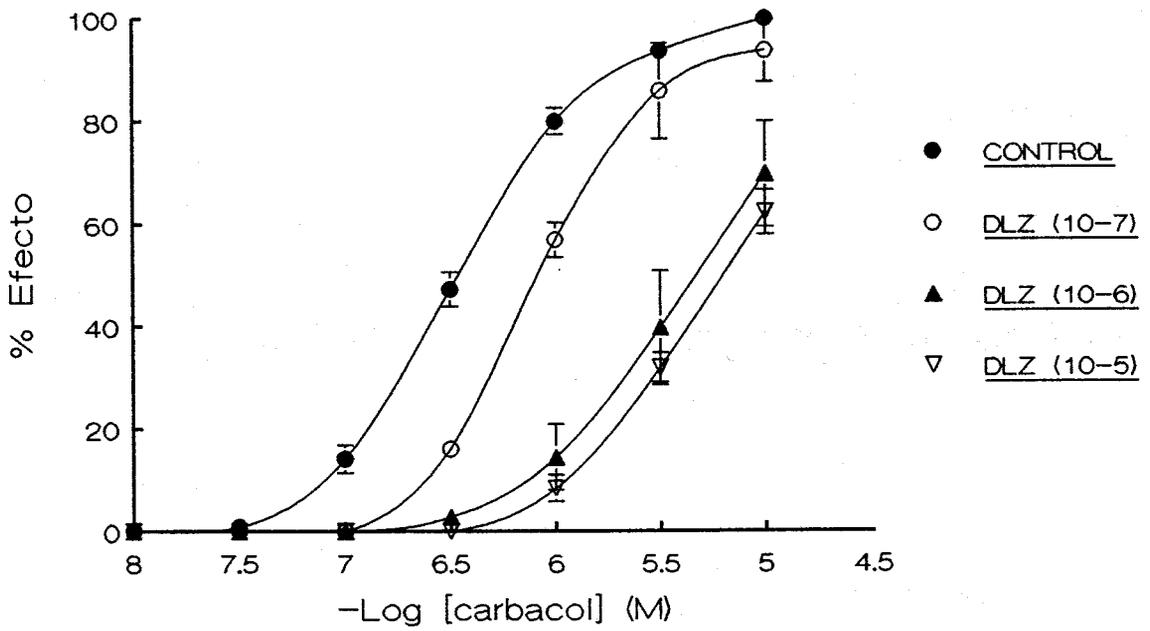


Figura 6

**Contracción inducida por carbacol
en traquea de rata.**

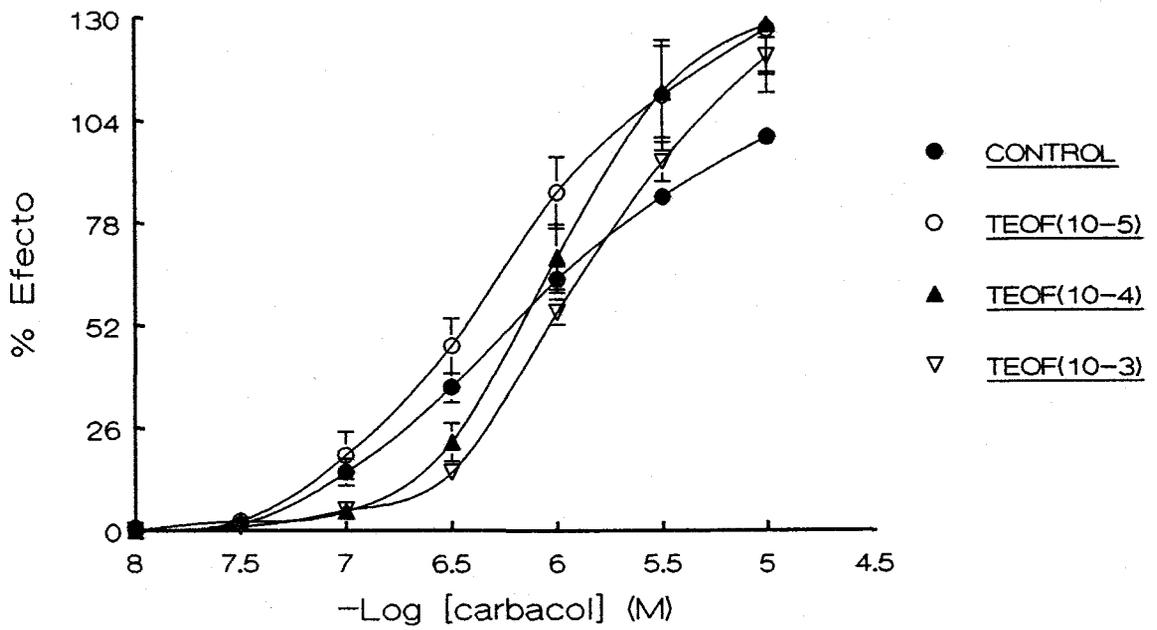


Figura 7

	E_{max} (%)	DE_{50} (M)
TETRAZEPAM (M)		
10^{-6}	100.00±0.00	$6.62±0.50×10^{-7}$
10^{-5}	93.88±2.90	$2.30±0.80×10^{-6}$ *
DILTIAZEM (M)		
10^{-7}	94.97±1.42	$1.02±0.20×10^{-6}$ *
10^{-6}	69.77±10.28	$3.63±0.80×10^{-6}$ *
10^{-5}	62.33±4.32	$6.55±0.95×10^{-6}$ **
TEOFILINA (M)		
10^{-5}	127.31±13.16	$1.32±0.26×10^{-7}$ *
10^{-4}	128.42±11.90	$7.54±0.92×10^{-7}$
10^{-3}	120.51±9.65	$1.11±0.14×10^{-6}$

Valores de DE_{50} y E_{max} de carbacol en presencia de los fármacos ensayados

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

TABLA II

III.5.- CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CaCl₂ EN MEDIO NOMINALMENTE LIBRE DE Ca²⁺.

II.5.1.- Desarrollo de la experiencia.

Para el desarrollo de esta experiencia utilizamos tráquea aislada de cobaya por ser más sensible que la de rata en medio desprovisto de calcio. Siguiendo la técnica de Godfraind (1968), se mantiene el órgano en solución Tyrode libre de calcio durante 60 min, con una tensión de 2 g. Posteriormente se sustituye esa solución por otra igual pero adicionada de EDTA 0.1mM con la que se hacen varios lavados durante 15 minutos. A continuación se sustituye por otra solución Tyrode enriquecida en K⁺ en la cual se mantiene incubando durante otros 15 minutos.

Tras obtener la curva control adicionando CaCl₂ de forma acumulativa, se realizan varios lavados con Tyrode libre de Ca²⁺ hasta conseguir la completa relajación del músculo y se repite todo el protocolo anterior, añadiendo la dosis de cada fármaco 15 min antes de comenzar una nueva curva de CaCl₂. Las dosis utilizadas fueron: tetrazepam (10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴M), diltiazem (10⁻⁸ y 10⁻⁶M) y teofilina (10⁻⁴ y 10⁻³M).

III.5.2.- Resultados.

Las experiencias llevadas a cabo en tráquea aislada de cobaya en medio nominalmente libre de calcio y despolarizado, frente a contracciones inducidas por CaCl_2 se ven reflejadas en las figuras 8, 9 y 10.

En la figura 8, podemos apreciar como tetrazepam es capaz de desplazar significativamente la curva dosis-respuesta de CaCl_2 hacia la derecha con la dosis de 10^{-5}M , llegando a una inhibición casi total con la de 10^{-4}M .

Las curvas obtenidas en presencia de diltiazem (figura 9) muestran un desplazamiento significativo con la dosis 10^{-6}M sin observar un efecto del efecto máximo.

En la figura 10, donde quedan reflejadas las inhibiciones provocadas por teofilina frente a las contracciones inducidas por CaCl_2 sólo las dosis de 10^{-3}M de la sustancia de estudio se muestra altamente efectiva llegando a producir casi la completa inhibición de la contracción.

Los valores de DE_{50} aparecen recogidos en la tabla III.

Contraccion inducida por CaCl2

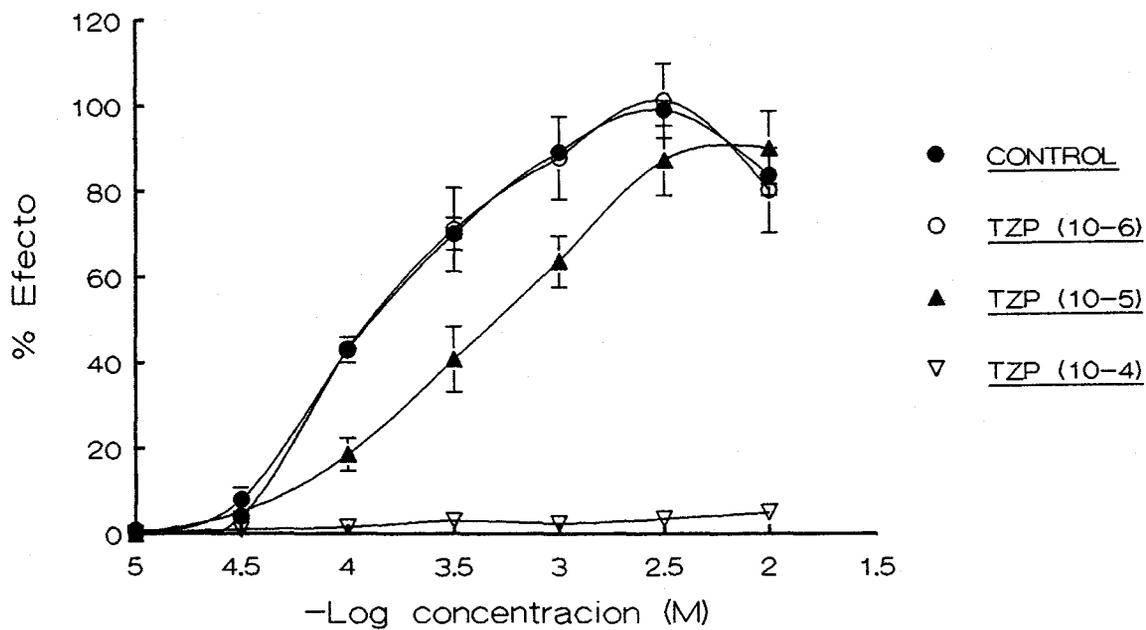


Figura 8

Contraccion inducida por CaCl₂

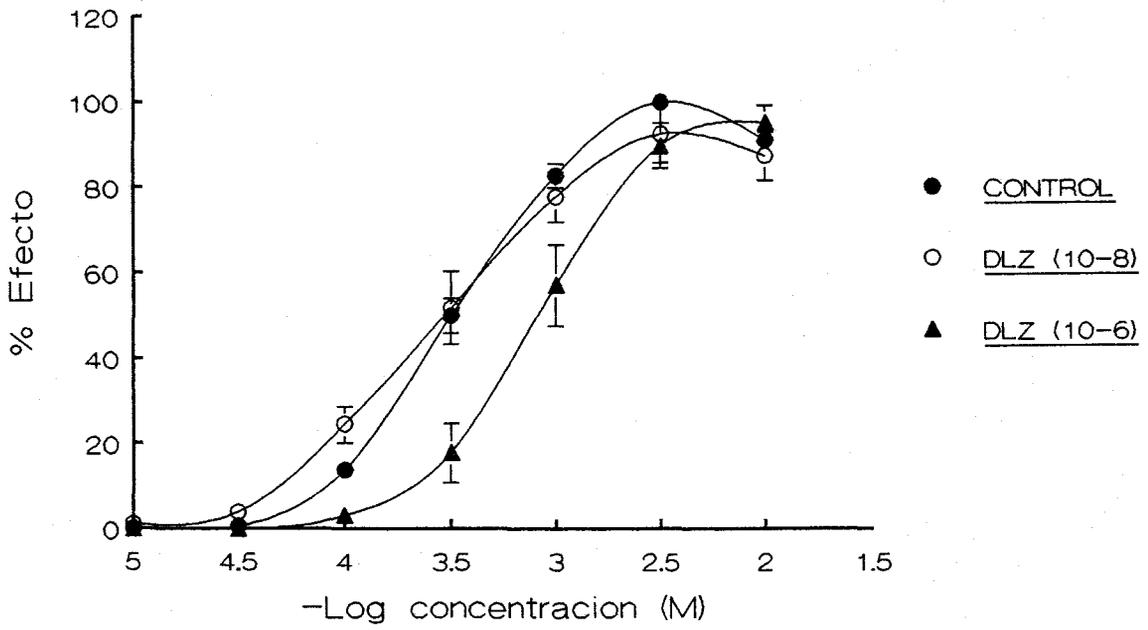


Figura 9

Contraccion inducida por CaCl2

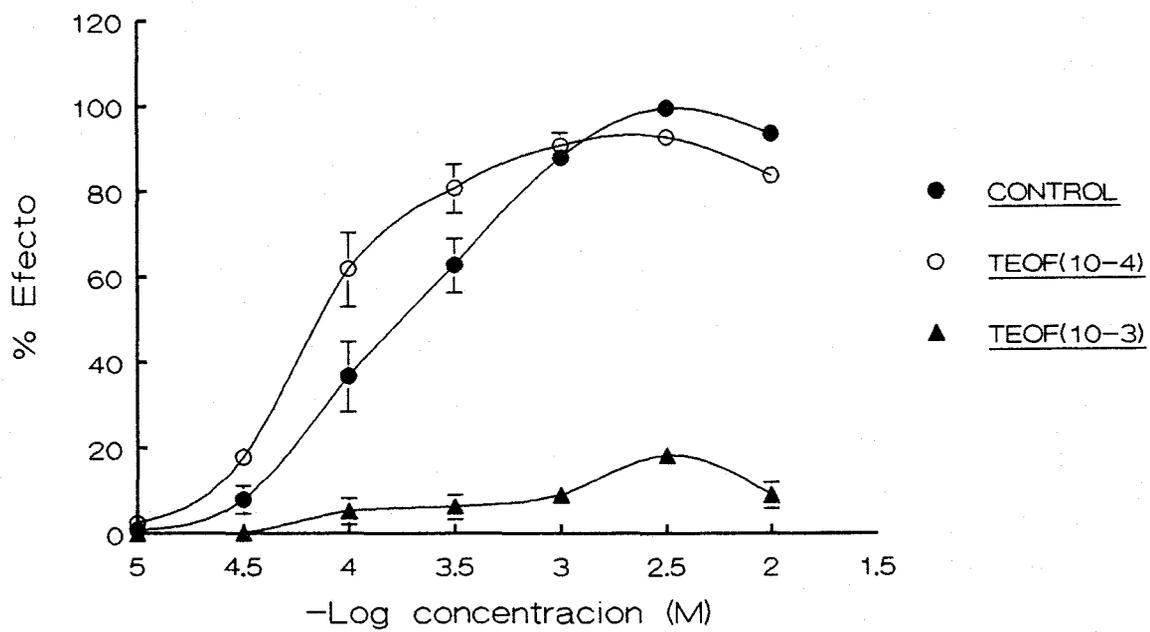


Figura 10

	E_{max} (%)	DE_{50} (M)
TETRAZEPAM (M) 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4}	106.19 ± 18.02 90.27 ± 9.20 4.96 ± 1.20	$2.48 \pm 1.36 \times 10^{-4}$ $5.11 \pm 1.08 \times 10^{-4} *$ -
DILTIAZEM (M) 10^{-8} 10^{-6}	92.56 ± 6.75 95.25 ± 4.10	$4.44 \pm 0.76 \times 10^{-4}$ $8.81 \pm 2.06 \times 10^{-4} *$
TEOFILINA (M) 10^{-4} 10^{-3}	92.79 ± 1.50 18.29 ± 1.00	$9.77 \pm 0.22 \times 10^{-5}$ -

Valores de DE_{50} y E_{max} de $CaCl_2$ en presencia de los fármacos ensayados

* $p < 0.05$

TABLA III

DISCUSION DE RESULTADOS

IV.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En las experiencias llevadas a cabo en músculo liso traqueal de rata y cobaya, tetrazepam presenta un efecto relajante frente a las contracciones inducidas por KCl (120mM), carbacol ($0.5 \times 10^{-6}M$) y $CaCl_2$ ($10^{-5} - 10^{-2}M$) en medio nominalmente libre de calcio y despolarizado con un comportamiento similar frente a los tres espasmógenos. Este tipo de antagonismo funcional indica que el efecto inhibitorio de tetrazepam no es debido simplemente a un antagonismo específico a nivel de receptor sino que probablemente deben estar involucradas interacciones con canales iónicos o un comportamiento sobre todos los receptores de una forma no específica.

Ya que la musculatura lisa traqueal presenta innervación colinérgica, hemos bloqueado previamente el receptor colinérgico con atropina ($10^{-6}M$) y los resultados obtenidos coinciden con los anteriormente expuestos, lo cual indica que no existe una implicación del receptor sino que habrá otros mecanismos involucrados en la acción relajante de tetrazepam.

A fin de ver la implicación de receptores benzodiazepínicos periféricos en el efecto de tetrazepam en musculatura de fibra lisa traqueal, hemos acudido al PK 11195 ($10^{-6}M$) coincidiendo de nuevo en la existencia de mecanismos inespecíficos ya que los valores de IC_{50} de tetrazepam en

ausencia y presencia de dicho antagonista no presenta diferencias significativas.

Intentando profundizar en los mecanismos implicados en los efectos relajantes de la musculatura lisa traqueal hemos provocado la contracción con CaCl_2 en medio libre de calcio ya que ésta depende sólo de la entrada de calcio externo a través de los canales VOCs comparando nuestros resultados con los obtenidos con diltiazem. Podemos comprobar que diltiazem, como era de esperar, se presenta más activo frente a los mismos al tratarse de un típico antagonista del calcio.

Los valores de IC_{50} de diltiazem tampoco se ven alterados al realizar experiencias con atropina.

Es sabido que la teofilina relaja la musculatura lisa previamente contraída por diferentes agentes espasmógenos. Por ello acudimos a ella realizando las experiencias en presencia de indometacina, agente inhibidor de la ciclooxigenasa, para eludir los efectos que ejercen los prostanoïdes a nivel de dicho órgano por tener la teofilina un mecanismo más inespecífico.

A las dosis seleccionadas, teofilina se presentó menos activa que tetrazepam y diltiazem, a pesar de haber utilizado dosis elevadas. Quizás por

su propio mecanismo había que incrementar las dosis de este agente para que se presente el efecto con mayor intensidad lo cual nos indica que tampoco el mecanismo de relajación presentado por tetrazepam está relacionado con una inhibición de la fosfodiesterasa.

A la vista de los resultados, podemos deducir que en conjunto, en el efecto relajante de tetrazepam interviene más de un mecanismo incluida su acción sobre las corrientes de calcio a través de canales voltaje dependiente y que será motivo de próximos estudios.

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES.

1.- Tetrazepam es capaz de inhibir las contracciones provocadas a nivel traqueal tanto por KCl como por carbacol consiguiendo el 100% de relajación.

2.- El bloqueo del receptor colinérgico con atropina no modificó el perfil de la curva dosis-respuesta, lo que demuestra que no existe participación de estos receptores en el efecto de tetrazepam.

3.- Tampoco media el efecto relajante el receptor benzodiazepínico periférico ya que la curva no se modificó al bloquear previamente con PK 11195 .

4.- De acuerdo con los resultados obtenidos, tetrazepam presenta un comportamiento inespecífico sin descartar un cierto bloqueo a nivel de canales de calcio.

BIBLIOGRAFIA

VI.- BIBLIOGRAFÍA.

ANTMAN, E . (1980). Nifedipine therapy for coronary-artery spasm: experience in 127 patients. *N. Engl. J. Med.* 302: 1269-1273.

BASSAN, M.; WEILER-RAVEIL, D.; SHALEV, O. (1982). The additive anti-anginal action of oral nifedipine in patients receiving propranolol. *Circulation.* 66: 710-716.

BARNARD, E.A., DARLISON, M.G. y SEEBURG, M. (1987). Molecular biology of the GABA_A receptor: The receptor/channel superfamily. *Trends Neurosci.* 10: 502-509.

BOLTON, T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev.* 59: 606-718.

BOLTON, TB; MaCKENZIE, I y AARONSON, PI. (1988). Voltaje-dependent calcium channels in smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 12(suppl 6): s3-s7.

BOSNJAK, ZJ. (1993). Ions channels in vascular smooth muscle: Physiology and Pharmacology. *Anesthesiology*. 79(6): 1392-1400.

CAERS, L.I.; DE BEUKELAAR, F.; AMERY, W.K. (1987). Flunarizine, a calcium-entry blockers, in childhood migraine, epilepsy, and alternating hemiplegia. *Clin. Neuropharmacol.* 10: 162-168.

CAMPBELL, KP; LEUNG, A.T. y SHARP, A.H. (1988). The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 11(10): 425-430.

CATTERALL, WA. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science.* 242: 50-61.

CATTERALL, WA y STRIESSNIG, J. (1992). Receptor sites for Ca^{2+} channels antagonist. *Trends Pharmacol Sci.* 13(6): 256-262.

CATTERALL, WA. (1993). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 16(12): 500-506.

CRIMI, N.; PALERMO, F.; SORACE, R.; GIBELLINO, F.; MISTRELLA, A. (1984). Effect of a calcium antagonist, nifedipine, in exercise induced asthma. *Respiration*. 45: 262-4.

DELGADO, C.; VALENZUELA, C.; DELPÓN, E. y TAMARGO, J. (1990). Antagonistas del calcio: mecanismo de acción y clasificación. *Medicine*, 5ª ed. (Septiembre): 9-15.

DOYLE, A.E. (1983). Comparison of beta-adrenoceptor blockers and calcium antagonist in hypertension. *Hypertension*. 5: II103-II108.

DUCSAY, C.A.; THOMPSON, J.S.; WU, A.T.; NOVY, M.J. (1987). Effects of calcium entry blocker (nicardipine) tocolysis in rhesus macaques: fetal plasma concentrations and cardiorespiratory changes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 1482-1486.

ETTINGIN, O.R.; HAJJAR, D.P. (1990). Calcium channel blockers enhance cholesteryl ester hidrolisis and decrease total cholesterol accumulation in human aortic tissue. *Circ Res*. 66: 185-90.

FANTA, C.H.; VENUGOPALAN, C.S.; LACOUTURE, P.G.; DRAZEN, J.M. (1982). Inhibition of bronchoconstriction in the guinea pig by a calcium bloker, nifedipine. *Amer Rev Resp Dis.* 125: 61-6.

FERRANTE, J.F.; TRIGGLE, D.J. (1990). Drug- and disease- induced regulation of voltage-dependent calcium channels. *Pharmacol Rev.* 42: 29-44.

FISCHHOF, P.K.; WAGNER, G.; LITSCHANER, G et al. (1989). Therapeutic results with nimodipine in primary degenerative dementia and multi-infarct dementia. In.: *BERGENER, M.; REISBERG, B. (Eds). Diagnosis and Treatment of Senile Dementia. Springer Verlag: Berlin.* 350-9.

FLECKENSTEIN, J.A.; KAMMERMEIER, H.; DORING, H.; and FREUD, H. J.(1967). Zum Wirkungs-Mechanismus neuartiger Koronardilatoren mit gleichzeitig Sauerstoff- einsparenden, myokard-Effekten, Prenylamin und Iproveratril. *Z. Kreislaufforsch.* 56: 716-744, 839-853.

FLECKENSTEIN, J.A. (1977). Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 17: 49-166.

FLECKENSTEIN, J.A.; FREY, M.; THIMM, F.; FLECKENSTEIN-GRUN, G. (1990). Excessive mural calcium overload - A predominant causal factor in the development of stenosing coronary plaques in humans. *Cardiovasc Drugs Ther.* 4(Suppl.5): 1005-14.

FORESI, A.; CORBO, G.M.; CIAPPI, G.; VALENTE, S.; PLOIDORI, G. (1987). Effect of two doses of inhaled diltiazem on exercise-induced asthma. *Respiration.* 51: 241-7.

FRISHMAN, W.H.; STROH, J.A.; GREENBERG, S.M.; SUAREZ, T.; KARP, A.; PELED, H.B. (1987). Calcium channel blockers in systemic hypertension. *Curr. Probl. Cardiol.* 12: 285-346.

GANDÍA, L; GARRIDO, B; MORO, MA; GARCÍA, AG. (1990). Moduladores de los canales de calcio: indicaciones terapéuticas y perspectivas. Ed. Nuevos Medicamentos. *La Granda (Asturias): Farmaindustria.* 31-54.

GIACHELLI, C.; BAE, N.; ALMEIDA, M. et al. (1993). Osteopontin expression is elevated during neointima formation in rat arteries and human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 92: 1686-96.

GREENBERG, D.A. (1986). Calcium channel antagonists and the treatment of migraine. *Clin. Neuropharmacol.* 9: 311-328.

GULAMHUSEIN, S.; KO, P; CARRUTHERS, S.G.; KLEIN, G.J. (1982). Acceleration of the ventricular response during atrial fibrillation in the Wolff-Parkinson-White syndrome after verapamil. *Circulation.* 65: 348-354.

HILLE, B. (1977). Local anaesthetics: Hydrophylic and hydrophobic pathways for drug-receptor reaction. *J Gen Physiol.* 69: 497-515.

HIMORI, N.; TAIRA, N. (1980). Differential effects of the calcium antagonist vasodilator, nifedipine and verapamil, on the tracheal musculature of the dog. *Brit J Pharmacol.* 68: 595-7.

HOLBROOK, R.H.; LIRETTE, M.; KATZ, M. (1987). Cardiovascular and tocolytic effects of nicardipine HCl in the pregnant rabbit: comparison with ritodrine HCl. *Obstet. Gynecol.* 69: 83-87.

HONDEGHEM, LM y KATZUNG, BG. (1984). Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of actions of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 24: 387-423.

HUGENHOLTZ, P.G.; MICHELS, H.R.; SERRUYS, P.W.; BROWER, R.W. (1981). Nifedipine in the treatment of unstable angina, coronary spasm and myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.* 47: 163-173.

INOUE, I.K.; MASSIE, B.M.; BENOWITZ, N.; SIMPSON, P.; LOGE, D. (1984). Antihypertensive therapy with diltiazem and comparison with hydrochlorothiazide. *Am. J. Cardiol.* 53: 1588-1592.

JACKSON, C.L.; BUSH, R.DC.; BOWYER, D.E. (1989). Mechanism of antiatherogenic action of calcium antagonist. *Atherosclerosis.* 80: 17-26.

JANIS, RA; SILVER, PJ; TRIGGLE, DJ. (1987). Drug action and cellular calcium regulation. *Advances in Drugs Research.* 16: 309-591.

KIMURA, E.; KISHIDA, H. (1981). Treatment of variant angina with drugs: a survey of 11 cardiology institutes in Japan. *Circulation.* 63: 844-848.

KIOWSKI, W.; BUHLER, F.R.; FADYOMI, M.; ERNE, P.; MULLER, F.B.; HULTHEN, U.L.; BOLLI, P. (1986). Age, race, blood pressure and renin: predictors for antihypertensive treatment with calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.* 56: 81H-85H.

KNORR, A.M.; KAZDA, S. (1990). Influence of nifedipine on experimental arteriosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 4(Suppl.5): 1027-32.

KOHLHARDT, M.; BAUER, B.; KRAUSE, H.; and FLECKENSTEIN, A. (1972). Differentiation of the transmembrane Na⁺ and Ca²⁺ channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflügers Arch.* 335: 309-322.

KOSTYUK, PG. (1989). Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience.* 28: 253-261.

LANDFIELD, P.W. (1989). Calcium homeostasis in brain aging and Alzheimer's disease. In.: *BERGENER, M.; REISBERG, B. (Eds). Diagnosis and Treatment of Senile Dementia. Springer Verlag .Berlin. 276-87.*

LE FUR, G.; VAUCHER, V.; PIERRIER, M.L.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; UZAN, A. (1983). Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites [³H Ro4-4864] and [³H PK 11195] by thermodynamic studies. *Life Sci.* 33: 449-454.

LEHMANN, H.V.; HOCHREIN, H.; WITT, E.; MIES, H.W. (1983).

Hemodynamic effects of calcium antagonists. *Review. Hypertension*. 5: 1166-1173.

LICHTLEN, P.R; HUGENHOLTZ, P.G; RAFFLENBEUL, W. et al.

(1990). Retardatio of coronary artery disease in humans by the calcium channels blockers nifedipine: results of the INTACT study (International Nifedipine Trial on Antiatherosclerotic Therapy) . *Cardiovasc Drugs Ther* .4: 1047-68.

LLINÁS, R; SUGIMORI, M; LIN, JW y CHERKSEY, B. (1989).

Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction(FTX) from funnelweb spider poison. *Proc Natl Acad Sci(E.E.U.U.)* .86: 1693-1698.

McGOVERN, B.; GARAN, H.; RUSKIN, J.N. (1986).

Precipitation of cardiac arrest by verapamil in patients with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Ann. Intern. Med.* 104: 791-794.

MESTRE, M., CARRIOT, C.; BERLIN, A.; UZAN, C.; RENAULT, M.C.;

DUBROEUCQ, C.; GUÉRÉMY, A. Doble and G. Le FUR. (1985).

Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral benzodiazepine receptors are coupled to calcium channels in the heart. *Life Sci.* 36, 391.

NAYLER, WG. (1988). Calcium antagonists. Londres: *Academic Press Limited*.

NEVEU, D; NARGEOT, J y RICHARD, S. (1993). Two high-voltage-activated, dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflügers Arch.* 424: 45-53.

NIELSEN-KUDSK, J.E.; KARLSSON, J.A.; PERSSON, C.G.A. (1986). Relaxant effects of xanthines, a b_2 -receptor agonist and Ca^{2+} antagonist in guinea-pig tracheal preparations contracted by potassium or carbachol. *European J. Pharmacol.* 128: 33-40.

OLESEN, J. (1986). Role of calcium entry blockers in the prophylaxis of migraine. *Eur. Neurol.* 25, Suppl. 1: 72-79.

ORALLO, F. (1992). Fármacos con nuevos mecanismos de acción: moduladores de los canales de potasio. *El farmacéutico.* 117: 42-48.

PATEL, K.R.; PEERS, E. (1988). Felodipine, a new calcium antagonist, modifies exercise-induced asthma. *Amer Rev Resp Dis.* 138: 54-6.

RAFFERTY, P.; VARLEY, J.G.; EDWARDS, J.S. (1987). Inhibition of exercise-induced asthma by nifedipine: A dose response study. *Brit J Clin Pharmacol.* 24: 479-84.

RANKIN, A.C.; RAE, A.P.; COBBE, S.M. (1987). Misuse of intravenous verapamil in patients with ventricular tachycardia. *Lancet.* 2: 472-474.

RAMPLE, D y TRIGGLE, DJ. (1989). News advances in molecular pharmacology of Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 388-389.

ROUGIER, O.; VOSSORT, G.; GARNIER, D.; GARGOUIL, Y. M.; and CORABOEUF, E. (1969). Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Arch.* 308: 91-110.

SCHWARTZ, P.J.; KEEFE, D.; KATES, R.E.; KIRSTEN, E. B.; HARRISON, D.C. (1982). Acute and chronic pharmacodynamic interaction of verapamil and digoxin in atrial fibrillation. *Circulation.* 63: 1163-1170.

SELWYN, A.P.; BRAUMWALD, E. (1989). Cardiopatía isquémica. En : Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Petersdorf, R.G.; Wilson, J.D; Martin J.B y Fauci, A.S. *Principios de medicina interna*. 11 Ed. Madrid. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill.: 1201.

SEVERI, S.; DAVIES, G.; MASERI, A.; MARZULLO, P.; L'ABBATE, A. (1980). Long-term prognosis of "variant" angina with medical treatment. *Am. J. Cardiol.* 46: 223-232.

SHARMA, S.K.; PANDE, N.J.; GULERIA, J.S. (1986). The effect of nifedipine on exercise-induced asthma. *J Asthma.* 23(1): 15-17.

SPEEDING, M.; FRASER, S; CLARKE, B y PATMORE L. (1990). Factors modifying the tissue selectivity of calcium-antagonists. *J Neural Transm.* 31: 5-16.

SPEEDING, M y MIRK, AK. (1987). Direct activation of Ca²⁺ channels by palmitoylcarnitine, a putative endogenous ligand. *Br J Pharmacol.* 93: 457-468.

SPIERINGS, E.L.H. (1988). Recent advances in the understanding of migraine. *Headache*. 28, 655-658.

TAMARGO J. (1986). Antagonistas del calcio: perspectivas presentes y futuras. *Farmacoterapia*. 3: 164-168.

TRIGGLE, DJ; SKATTLEBOL, A; RAMPE, D; JOSLYN, A y GENGO, P. (1986). Chemical pharmacology of Ca^{2+} channel ligand. New Insights into cell and membrane processes (POSTE, G editor). *Plenum Press. Nueva York*. 125-143.

TSIEN, RW; ELLINOV, PT; HORNE, WA. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} -channels. *Trends in Pharmacological Sciences*. 12: 349-354.

TUCK, H. (1988). Diabetes and hypertension. *Tijdschr voor Geneeskunde*. 44: 13.

TYGAT, J; VEREECKE, J; CARMELIET, E. (1988). Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type and T-type calcium channels. *Naunym-Schmied Arch Pharmacol*. 337: 690-692.

WATERS, D.D.; THEROUX, P.; SZLACHCIC, J.; DAUWE, F. (1981).

Provocative testing with ergonovine to assess the efficacy of treatment with nifedipine, diltiazem and verapamil in variant angina. *Am. J. cardiol.* 48: 123-130.

WATERS, D; LESPERANCE, J; FRACETICH, M et al. (1990). A

controlled clinical trial to assess the effect of a calcium channel blocker upon the progression of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 82: 1949-53.

ZBINDEN, G.; RANDALL, L.O. (1967). Pharmacology of

benzodiazepines: laboratory and clinical correlations. *Advances in Pharmacol.* 5: 213-291.

ZERNING, G. (1990). Widening potential for calcium antagonist: Non-L-

type Ca^{2+} channel interaction. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 38-44.