

FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA

Queda tomada razón de este Título y registrado al 1.º ..... n.º  
del libro correspondiente.

Madrid, 27 de Septiembre de 1984  
EL PROFESOR SECRETARIO,

*27 Septiembre 1984*  
*[Signature]*  
*[Signature]*  
*[Signature]*

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

616.13 (043.2)  
SAN  
atp  
T

ATPasa Na - K DEPENDIENTE Y REACTIVIDAD VASCULAR  
EN ARTERIAS CEREBRALES Y FEMORALES AISLADAS DE GATO.

TESIS DOCTORAL

CARLOS FELIX SANCHEZ FERRER

Ry. F. M. 6-851

1.984



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

JESUS MARIN LOPEZ, Profesor Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

C E R T I F I C A : Que CARLOS FELIX SANCHEZ FERRER, ha realizado bajo su dirección en dicho Departamento el trabajo titulado: "ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  DEPENDIENTE Y REACTIVIDAD VASCULAR EN ARTERIAS CEREBRALES Y FEMORALES AISLADAS DE GATO", como Tesis para la obtención del título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a cinco de Julio de mil novecientos ochenta y cuatro.

Edo.: Dr. Jesús Marín López

*A mis padres*

*Esta Tesis se ha realizado merced a una Beca de Formación de Personal Investigador, y ha sido subvencionada en parte con Ayudas de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Marín López, director de esta Tesis, por su constante orientación y dedicación en la prolongada tarea de elaborar estas páginas.

A la Dra. Mercedes Saláices Sánchez, por su desinteresada ayuda en numerosos experimentos, y su estímulo y comprensión a lo largo de todo el trabajo.

Al Prof. Pedro Sánchez García, director del Departamento de Farmacología y Terapéutica, por haberme brindado la posibilidad de llevar a cabo el presente estudio.

Al Prof. Antonio García García, que nos facilitó amablemente los compuestos de vanadio utilizados en este trabajo.

A todos los miembros del Departamento que han colaborado de una y otra forma, con su aliento y amistad, en la realización de esta Tesis.

*"No hay cuestiones agotadas, sino  
hombres agotados en las cuestiones"*

SANTIAGO RAMON Y CAJAL

# I N D I C E

	<u>Páginas</u>
INTRODUCCION .....	1
- ATPasa dependiente de sodio y potasio: estructura y función .....	2
- Interacción de los glucósidos cardiotó- nicos con la ATPasa Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> dependiente. Acciones sobre el miocardio .....	5
- Digitálicos y liberación de catecolaminas ...	11
- Digitálicos y músculo liso vascular .....	15
- Compuestos de vanadio .....	19
- Músculo liso y regulación de la bomba de sodio .....	24
OBJETIVOS .....	30
MATERIAL Y METODOS .....	33
RESULTADOS .....	41
. <u>Estudios de contractilidad</u> .....	41
- Efecto de ouabaina sobre la reactividad de arterias cerebrales de gato .....	41
- Efectos contráctiles de ouabaina sobre arterias femorales de gato .....	49
- Efecto de vanadato en arterias cerebrales de gato .....	57
- Acciones vasoconstrictoras de vanadato en arterias femorales de gato .....	65
- Efecto de la administración conjunta de ouabaina y vanadato en arterias cerebra les y femorales de gato .....	72
- Efecto de la reducción del sodio extracel lular (11.9 mM) en arterias cerebrales y femorales de gato .....	77
- Influencia de la concentración extracelular de K sobre la contracción de las arterias cerebrales y femorales de gato .....	85

I N D I C E (Cont.)

	<u>Páginas</u>
. <u>Liberación de H<sup>3</sup>-noradrenalina</u> .....	91
- Flujo espontáneo de tritio .....	91
- Liberación de H <sup>3</sup> -noradrenalina en arterias cerebrales y femorales de gato inducida por ouabaina .....	95
- Liberación de H <sup>3</sup> -noradrenalina inducida por vanadato en arterias cerebrales y fe- morales de gato .....	103
DISCUSION .....	110
- Efecto de ouabaina y vanadato en la con- tracción vascular .....	110
- Efecto de ouabaina y vanadato en la li- beración de noradrenalina .....	120
CONCLUSIONES .....	123
RESUMEN .....	126
BIBLIOGRAFIA .....	128



INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto que producen algunos fármacos bloqueantes de la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger}\text{-K}^{\dagger}$  dependiente (ouabaina y compuestos de vanadio) en arterias cerebrales y femorales de gato, e investigar los mecanismos de acción de estos agentes en ambos tipos de vasos, analizando las posibles analogías entre ellos. Por ello, en esta INTRODUCCION se realizará una revisión actualizada de las propiedades de dichos fármacos, subdividiéndola en los siguientes apartados:

- ATPasa dependiente de sodio y potasio: estructura y función.
- Interacción de los glucósidos cardiotónicos con la ATPasa.  $\text{Na}^{\dagger}\text{-K}^{\dagger}$  dependiente. Acciones sobre el miocardio.
- Digitálicos y liberación de catecolaminas.
- Digitálicos y músculo liso vascular.
- Compuestos de vanadio.
- Músculo liso y regulación de la bomba de sodio.

## ATPasa DEPENDIENTE DE SODIO Y POTASIO: ESTRUCTURA Y FUNCION

Las células excitables tienen una concentración intracelular de potasio muy superior a la del espacio extracelular, y el fenómeno inverso ocurre con los niveles de sodio. Este hecho se debe en parte a la distinta permeabilidad de la membrana celular en reposo para estos iones. Sin embargo, tal distribución iónica no podría mantenerse de no existir un sistema activo, localizado en la membrana, que actúa contra gradiente incorporando potasio al interior y expulsando sodio al medio extracelular. Este mecanismo, conocido como bomba de sodio y potasio, se describió como un sistema enzimático consumidor de energía (por desdoblamiento de ATP) y dependiente de los iones sodio y potasio.(1).

Diversas investigaciones han demostrado que dicha enzima purificada es capaz de establecer un transporte acoplado de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , dependiente de ATP, en vesículas fosfolípidicas reconstruidas (2,3), lo que supone una evidencia directa de que la enzima ATPasa  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  dependiente es de hecho la bomba de sodio y potasio.

Esta enzima posee una estructura dimérica en la que cada monómero constituyente se compone a su vez de dos subestructuras, una subunidad catalítica y otra glicoproteica (4), con un peso total de 280.000 daltons (5). La subunidad catalítica (subunidad-alfa) tiene un peso de 90.000 a 100.000 daltons y es fosforilada por el ATP en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ ; la subunidad-beta o glicoproteica tiene un pe--

so total de 40.000 daltons y su papel funcional es desconocido (5,6), aunque se encuentra unida covalentemente a la subunidad catalítica y los anticuerpos contra ella inhiben la actividad de la bomba de sodio (7). El papel de los lípidos de membrana en el funcionamiento de la ATPasa no está totalmente dilucidado; sin embargo, parece que son necesarios una serie de fosfolípidos cargados negativamente para mantener su actividad enzimática, e incluso para la acción de los glucósidos cardiotónicos (8).

#### Mecanismo de acción

El mecanismo molecular de la bomba de sodio no ha sido todavía aclarado por completo. Presumiblemente la enzima hidroliza el ATP, sufre un cambio conformacional por fosforilación de la subunidad catalítica, en presencia de  $Mg^{2+}$ , e incorpora el  $Na^+$  intracelular a su estructura. El ión  $Ca^{2+}$  puede competir con el  $Mg^{2+}$  e inhibir este proceso. Posteriormente se libera el sodio al espacio extracelular y se fija al sistema el potasio, con un nuevo cambio conformacional de la enzima. Finalmente la ATPasa fosforilada es atacada por el agua, lo que ocasiona la liberación del fosfato inorgánico y del ión potasio al interior celular (6,9). Mientras que la acción del sodio en este ciclo no es mimetizada por otros cationes monovalentes, salvo por el litio, el potasio puede ser sustituido por rubidio, cesio, amonio o talio (1, 9). Mediante este dispositivo la bomba de sodio es capaz de expulsar tres iones de sodio por cada dos de potasio incor-

porados (5,10).

Se han descrito una amplia variedad de situaciones experimentales o fármacos capaces de inhibir la actividad de la enzima ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente (11). Los digitálicos son probablemente los agentes más interesantes y más conocidos en este aspecto, y el estudio detallado de sus efectos se realiza en el apartado siguiente. Otro procedimiento también utilizado para inhibir la bomba de sodio ha sido la sustracción de los cationes monovalente sodio y potasio, sustratos de la enzima, que parecen ser básicos para que la bomba ejerza su acción (12). Un nuevo agente con alta capacidad -- inhibidora de la ATPasa demostrado recientemente es el vanadato (13), del que nos ocuparemos también en páginas posteriores. Existe además un amplio grupo de compuestos en los que se ha evidenciado actividad bloqueante de la ATPasa, tales como quinidina, clorpromacina, para-cloromercuribenzoato, fosfolipasa-A, tritón X-100, etanol, tetraetilamonio, -- N-etilmaleimida o sales de bario y cobre (11), que tienen -- desde nuestro punto de vista un interés menor.

Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo de modulación de la actividad enzimática de la bomba de sodio regulado por el nivel intracelular de AMPc (5). Según tal hipótesis, la estimulación de los receptores beta-adrenérgicos y el incremento de actividad de la adenil-ciclase suponen un aumento de la formación de AMPc, que a su vez activa una proteína-quinasa AMPc-dependiente, probablemente merced a una --

subunidad reguladora de la misma. La protein-quinasa activada puede a su vez fosforilar la subunidad catalítica de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, o bien cierta proteína de membrana de un peso de unos 12.000 daltons, adyacente a la enzima, que podría conducir a un incremento de la actividad de la bomba de sodio (5). Esta teoría posee considerable interés en tanto que permite establecer una relación directa entre los niveles de catecolaminas circulantes y el grado de actividad de la ATPasa.

#### INTERACCION DE LOS GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS CON LA ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ DEPENDIENTE. ACCIONES SOBRE EL MIOCARDIO

En 1785 William Withering, médico inglés, realizó un detallado estudio de las hojas de la dedalero, o digital, y su efecto beneficioso en determinados pacientes que presentaban ascitis y anasarca, atribuyéndolo a una acción diurética directa sobre el riñón (14). Posteriormente se observó -- que la digital sólo era eficaz en el tratamiento de los edemas de origen cardíaco, y que su órgano diana era primordialmente el corazón. En 1940 se comprobó que el efecto farmacológico principal de todos los glucósidos cardiotónicos consistía en un aumento de la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo) del músculo cardíaco (15).

Aunque su utilización terapéutica ha sido habitual desde entonces, fundamentalmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, el mecanismo íntimo merced al cual es-

tos fármacos ejercen su acción ha sido desconocido hasta hace muy poco tiempo, y aún hoy no está totalmente desvelado, ya que todavía perdura la controversia acerca de las modificaciones moleculares que expliquen sus efectos farmacológicos, terapéuticos y tóxicos.

Los glucósidos cardiotónicos se unen de manera específica a la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, bloquean su actividad enzimática y alteran el transporte activo de los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (1, 4, 16, 17, 18, 19). Los digitálicos se unen a la bomba de sodio en lugares específicos localizados en la parte de la enzima situada extracelularmente, al parecer en la alfa-subunidad o subunidad catalítica (10, 20, 21). El efecto de los glucósidos es de duración muy prolongada, ya que se forman enlaces hidrofóbicos en la unión fármaco-receptor que le confieren gran estabilidad (21,22).

Merced a estudios con técnicas de fijación (binding) con digitálicos marcados ( $\text{H}^3$ -ouabaina) se han descrito al menos dos diferentes lugares de fijación para el radioligando, de alta y baja afinidad respectivamente (23,24,25). La hipótesis más aceptada supone que estos distintos "binding sites" representan sólo diversas conformaciones estructurales que puede adquirir la bomba de sodio (5, 25).

Por otra parte, el ambiente iónico que rodea la ATPasa posee considerable influencia en la interacción de los digitálicos con la enzima. En efecto, se ha comprobado que el  $\text{Mg}^{2+}$  es imprescindible para la fijación del digitálico a

la bomba de sodio (6) y que incluso la mera presencia de este ión parece ser suficiente para inducir cambios estructurales de la enzima, de tal manera que la ouabaina, un digitálico, puede unirse a ella sin precisar la presencia de otros sustratos como el ATP y el sodio (26).

Por el contrario, el potasio es un conocido antagonista de la inhibición de la ATPasa por los digitálicos (27, 28). La tasa de unión (binding) de la ouabaina sobre la bomba de sodio es inversamente proporcional a la concentración extracelular de potasio (28, 29, 30). El  $K^+$  se fija a la enzima por su cara externa, en un punto diferente al de unión de la ouabaina (9). Se trata de un lugar de unión para los cationes monovalentes,  $Na^+$  y  $K^+$ , cuya ocupación produce cambios en la afinidad de la enzima para el digitálico, aumentándola o disminuyéndola según sea el  $Na^+$  o el  $K^+$ , respectivamente, el ión fijado (5,9,28).

La sensibilidad de la ATPasa al bloqueo por los glucósidos varía mucho según la especie animal de procedencia. Así, la de corazón de rata es particularmente resistente a los digitálicos (31), mientras que las provenientes de cobayo, perro y gato son considerablemente más susceptibles (24, 31) y la ATPasa humana es extremadamente sensible a la acción de los cardiotónicos (24). Por este motivo, la concentración necesaria para producir bloqueo de la bomba de sodio oscila entre  $10^{-8}$  y  $10^{-4}$  M, dependiendo de la especie estudiada. Esta última concentración induce una inhibición prácticamente



total en todas las especies animales y condiciones experimentales empleadas (20).

### Acciones sobre el miocardio

En 1964 Repke (32) sugirió que el efecto terapéutico habitual de los glucósidos cardiotónicos se sustentaba en su capacidad para inhibir la bomba de sodio, y lo propuso como mecanismo de acción de estos fármacos. En apoyo de esta hipótesis se han realizado numerosos estudios que pretenden delimitar la cadena de acontecimientos intracelulares que, partiendo del bloqueo de la ATPasa de membrana, concluya en un incremento de la fuerza de contracción miocárdica. Por un lado, algunos autores suponen que los digitálicos alteran la conformación de la bomba de sodio, e inician cambios en los fosfolípidos de membrana adyacentes a la misma, supuestamente implicados en la fijación del calcio, lo que conduce a un aumento de la disponibilidad intracelular de este ión que, a su vez, provoca un incremento de la actividad contráctil de las miofibrillas (5, 33, 34).

Por otro lado, se ha implicado en la acción de los digitálicos un sistema de intercambio  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular (35,36). En efecto, la existencia de un mecanismo de esta naturaleza fué puesta de manifiesto por -- Reuter y Seitz ( 37 ) en músculo cardíaco y Baker y col.

( 38 ) en axón gigante de calamar. Se trata de un sistema que aprovecha la energía potencial creada por el gradiente electroquímico de sodio para transportar un ión

$\text{Ca}^{2+}$  a cambio de dos o más iones  $\text{Na}^+$  (39,40,41). Habitualmente este dispositivo constituye un mecanismo de extrusión, junto con la bomba de calcio, del exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado -- tras sucesivas depolarizaciones (40,41,42,43). El sistema no precisa ATP como fuente de energía (43,44), aunque parece que la presencia de esta molécula aumenta la afinidad del transportador por el sodio extracelular (45). El sentido de este intercambio puede, sin embargo, alterarse si el gradiente de sodio sufre variaciones. De este modo, si la concentración -- de  $\text{Na}^+$  extracelular disminuye o la intracelular aumenta, como ocurre cuando se bloquea la  $\text{ATPasa Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, se produce la inversión del mecanismo, lo que origina una corriente de calcio hacia el interior celular. (41, 42, 43, 46, 47).

Apoyando esta hipótesis está el hecho de que la -- disminución de la concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular ocasiona un aumento de la contractilidad en la aurícula de cobayo, y reduce además la velocidad de relajación muscular(48). Asimismo, la depleción de sodio potencia el efecto de la cafeína, fármaco que bloquea la incorporación de  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo sarcoplásmico y en consecuencia retrasa la velocidad de relajación muscular (48). No obstante, cierta cantidad de sodio en el medio es necesaria para que los digitálicos puedan ejercer -- su efecto inotrópico positivo, dado que la supresión total -- de  $\text{Na}^+$  abole las acciones de la ouabaina y su reintroducción supone la recuperación de las mismas (48).

En disconformidad con lo hasta aquí expuesto, algunos autores han demostrado que los digitálicos en bajas concentraciones no sólo no inhiben sino que, incluso, pueden incrementar la incorporación de potasio marcado en músculo auricular de cobayo, lo que representa un aumento de la actividad de la bomba de sodio, pese a mantener su capacidad inotrópica positiva (49, 50). Tales hechos han llevado a suponer la existencia de una total o parcial independencia entre el bloqueo de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente y la capacidad de incrementar la fuerza de contracción cardíaca, efectos ambos producidos por los cardiotónicos (51).

Sin embargo, es preciso tener en cuenta la posible participación de las catecolaminas almacenadas en el miocardio en los efectos farmacológicos de los glucósidos cardíacos. Seifen (52) observó que los beta-bloqueantes antagonizaban el efecto de ouabaina en la aurícula de cobayo. Asimismo, demostró que este digitálico ocasionaba una elevación de la liberación de noradrenalina tritiada de este mismo tejido. Además, se ha encontrado que los cardiotónicos inhiben la incorporación (uptake) de noradrenalina en las terminaciones simpáticas cardíacas (53). En base a estos hallazgos se ha pretendido demostrar que la estimulación de la ATPasa con bajas concentraciones de digitálicos se debe a la secreción de noradrenalina de sus depósitos y al bloqueo de su recaptación (10). En este sentido, se ha observado que los bloqueantes beta-adrenérgicos, la reserpinización o la

administración de 6-hidroxi-dopamina suprimen el incremento de actividad de la bomba de sodio inducida por ouabaina o isoproterenol, medido por la incorporación de  $RB^{86}$  a la célula miocárdica (10).

En resumen el efecto inotrópico positivo de los digitálicos se puede explicar, según Langer (10), de la siguiente manera :

- Las concentraciones bajas de digitálicos elevan el nivel de catecolaminas en la superficie de la célula cardíaca. Estas aminas, actuando sobre receptores beta-adrenérgicos, incrementan por un lado la fuerza de contracción miocárdica y por otro estimulan la actividad de la ATPasa, enmascarando el efecto inhibitorio directo de los cardiotónicos.
- En concentraciones superiores se produce una marcada inhibición de la bomba de sodio, lo que invierte el funcionamiento normal del sistema de intercambio  $Na^+$  -  $Ca^{2+}$  y provoca una corriente de calcio hacia el interior celular, -- que es en definitiva lo que incrementa la contractilidad cardíaca.

#### DIGITALICOS Y LIBERACION DE CATECOLAMINAS

Se admite de forma general que la inhibición de la bomba de sodio en la membrana de las terminaciones nerviosas simpáticas, o células cromafines, produce un incremento de la liberación del neurotransmisor adrenérgico de las mismas (11). De hecho, diversos procedimientos, que aparente-

mente bloquean la actividad de la enzima ATPasa Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> dependiente, tienen en común la capacidad de secretar catecolaminas (CA) de sus lugares de almacenamiento. Así, la supresión de sodio extracelular origina un aumento de la liberación espontánea de CA de la médula adrenal y una potenciación de la respuesta secretora inducida por otros estímulos (54). Resultados parecidos se han hallado en tiras de bazo de gato (12) o en aorta de conejo (55). Otro mecanismo utilizado para inhibir la bomba de sodio, la depleción de K<sup>+</sup> extracelular, supone asimismo una elevación de la noradrenalina liberada en diversos tipos de músculo vascular liso (55,56,57,58).

Los glucósidos carditónicos son también, como ya se ha descrito, potentes inhibidores de la ATPasa y los estudios encaminados a establecer su capacidad liberadora de CA han dado resultados positivos. Los digitálicos pueden secretar NA de múltiples tejidos inervados por el simpático, tales como corazón (52), bazo (12,59), conducto deferente (60, 61) y músculo liso vascular (55,56,57,62). Además, otro tipo de tejido capaz de secretar grandes cantidades de CA, la médula adrenal, es sensible a la acción de los glucósidos carditónicos; la liberación espontánea de CA en suprarrenales de buey, gato, rata o cobaya es significativamente incrementada por la ouabaina (63,64,65), facilitándose también la secreción inducida por otros tipos de estimulación (65).

En condiciones fisiológicas, la liberación de CA de sus lugares de almacenamiento se realiza mediante el pro-

ceso de la exocitosis, es decir con la fusión de las vesículas adrenérgicas con la membrana celular y la consiguiente - expulsión de todo su contenido soluble al exterior celular - (66,67). En este caso, junto al transmisor adrenérgico, se puede recoger una secreción paralela de diversos compuestos que acompañan a las catecolaminas en las vesículas. Entre estas sustancias destaca la Dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), - enzima que transforma la dopamina en noradrenalina (67). Otra peculiaridad de la liberación exocitótica es que necesita, para llevarse a cabo, la presencia de iones calcio en el medio extracelular (68). Las CA pueden secretarse también por un mecanismo no exocitótico, no habitual fisiológicamente, y cuyo ejemplo más típico está representado por la secreción - inducida por tiramina, agente simpaticomimético de acción indirecta. La liberación no exocitótica se caracteriza por la -- ausencia de DBH junto al transmisor adrenérgico, así como por su independencia del ión calcio extracelular (69).

La secreción de CA de la médula adrenal, inducida por digitálicos se acompaña de una liberación paralela de -- DBH, y es extremadamente sensible al calcio extracelular, -- puesto que se abole por completo en un medio carente de este ión (64,65). Ambos parámetros indican que, muy probablemente, los glucósidos cardiotónicos actúan sobre la célula cromafin desencadenando un proceso de carácter exocitótico, similar - al fisiológico (64,70).

El fenómeno de la exocitosis requiere un aumento -

previo de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (69). La inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, presumible efecto de los digitálicos, y la consecuente elevación del nivel citoplasmático de sodio puede producir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular de dos maneras posibles; bien por depolarización de la membrana, con la apertura de los canales de calcio voltaje-dependiente, o bien por la inversión del intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ , descrito en páginas anteriores (64). Diversos trabajos señalan este mecanismo como el más probable (64,65,70).

No obstante, persiste cierta controversia puesto - que algunos autores han encontrado liberación de CA, inducida por <sup>los</sup> cardiotónicos, independiente de la existencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (71), lo que hace suponer variaciones en la respuesta a digitálicos según el tejido o la especie animal elegidos, o, más probablemente, alteraciones del mecanismo de liberación dependientes de la concentración del glucósido. En este sentido, se ha sugerido que las dosis elevadas de cardiotónicos pueden tener un componente no excitótico de secreción de CA, de tipo tiraminérgico (72). Por otro lado, se conoce que los digitálicos interfieren con el sistema de incorporación de CA de las terminaciones nerviosas adrenérgicas (uptake 1) (53), lo que igualmente puede contribuir al incremento de noradrenalina en la hendidura sináptica. En cualquier modo, el factor fundamental de la reducción del contenido de CA de sus depósitos por los digitálicos parece ser su capacidad de liberación del neurotransmisor adrenérgico (72).

## DIGITALICOS Y MUSCULO LISO VASCULAR

Desde hace algunos años se conoce que los glucósidos cardiotónicos o los procedimientos capaces de bloquear la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, como la depleción de  $\text{K}^+$  extracelular, pueden originar un aumento en la tensión de la pared vascular (73,74). En efecto, la capacidad vasoconstrictora de los digitálicos se ha comprobado en vasos de diversas especies animales, tales como cobayo (75,76), perro (62,77), rata (56,78), conejo (57) y hombre (79). Esta respuesta ha sido atribuida a la inhibición de la bomba de sodio por tales procedimientos, lo que ha sugerido que la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente puede jugar un cierto papel en la regulación de la -- contractilidad vascular (80, 81, 82, 83).

Actualmente se considera que la ATPasa existente en la pared de los vasos es muy similar a la encontrada en otro tipo de tejidos (84). Los estudios con radioligandos -- han demostrado una fijación específica de ouabaina marcada, en enzima purificada de músculo liso vascular, parecida a la de ATPasa de riñón o corazón, aunque quizá de menor intensidad (77,85). La medición directa de la actividad enzimática de la bomba de sodio, por desdoblamiento de ATP, en homogenizados o fracciones subcelulares vasculares ha da-- do como resultado una tasa de actividad muy baja, en comparación con otros tejidos (86,87,88). Sin embargo, tal variación se explica probablemente en base a factores cuantitativos y no en diferencias cualitativas. En este sentido las estima--



ciones acerca de la cantidad de ATPasa presente en la membrana celular oscilan entre unas 74 unidades por micrómetro cuadrado de superficie, en el caso de la aorta de conejo, y unas 760 unidades en músculo papilar de gato (77,85). Por otra parte, estudios recientes sobre la actividad de la enzima, en cultivo "in vitro" de células musculares lisas de origen vascular, han encontrado una cinética muy parecida a la hallada en otros tejidos (89,90).

En cualquier caso el funcionamiento de la bomba de sodio vascular es siempre susceptible de ser bloqueada por los digitálicos (77); este hecho constituye actualmente un punto de partida aceptado para tratar de explicar los mecanismos de acción de estos fármacos sobre la pared de los vasos (91).

Se han propuesto diversos mecanismos que justifiquen la contracción inducida por los cardiotónicos, apoyados todos ellos en la inhibición de la bomba de sodio. En primer lugar, el bloqueo de la ATPasa, enzima que participa en el mantenimiento del gradiente electroquímico, puede originar una rápida depolarización de la membrana, parecida a la que ocurre en la estimulación fisiológica, con la consiguiente apertura de los canales de calcio voltaje dependientes y entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol que, al alcanzar la concentración adecuada y unirse a la troponina, permite que actina y miosina se acoplen, con la subsiguiente contracción de los miofilamentos (82,84,92).

den secretar noradrenalina marcada en arterias con densa inervación simpática (56,58,95), así como en otros tipos de músculo liso no vascular (96,97,98). Además, dependiendo de la especie animal elegida y del lecho vascular estudiados,

la acción constrictora de los cardiotónicos puede ser parcialmente sensible a los alfa-bloqueantes, o a otros procedimientos que impiden la liberación del neurotransmisor adrenérgico, como la reserpinización o la administración de 6-hidroxidopamina (56, 60, 77, 78). Sin embargo, en determinados vasos, e incluso especies concretas como el hombre, la acción de los digitálicos es totalmente resistente a las citadas maniobras (57,79).

Los mecanismos específicos de los cardiotónicos para liberar noradrenalina de las terminaciones simpáticas constituyen a su vez motivo de debate. La capacidad de estos fármacos para bloquear la recaptación de catecolaminas por las varicosidades adrenérgicas ha sido también mencionada (53). La posibilidad de que sea la depolarización de la membrana neuronal, al bloquearse la bomba de sodio, la responsable de la secreción de noradrenalina no ha sido aún descartada (77, 99). Por último, se ha involucrado de nuevo el sistema de intercambio Na<sup>+</sup> - Ca<sup>2+</sup> cuya existencia ha sido demostrada en este tipo de estructuras (70, 91, 96, 98).

Además, se ha observado que los digitálicos pueden liberar noradrenalina del lecho vascular mediante un mecanismo no excitótico, de tipo tiraminérgico, independiente del

calcio extracelular, a diferencia de los mencionados anteriormente (78). Incluso está descrita, en conducto deferente de cobayo, la capacidad de estos fármacos para secretar catecolaminas a partir de depósitos extraneuronales de la mismas, y producir de este modo algún tipo de contracción (97).

### COMPUESTOS DE VANADIO

El vanadio ha tenido hasta hace unos años un interés exclusivamente toxicológico, habiéndose descrito sus compuestos como poderosos venenos para los animales y el hombre (100). Por ello, surgió un cierto interrogante cuando se encontraron trazas de este elemento ampliamente distribuidas en tejidos animales, comprobándose que pequeñas cantidades de vanadio constituyen un factor esencial en la dieta de animales como la rata y el pollo, y muy posiblemente en la del hombre también (101, 102, 103).

El descubrimiento hecho por Cantley y col. en 1977 (13) de que ciertas impurezas de preparados de ATP, obtenidos de músculo equino, eran capaces de inhibir la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, y el que tales contaminantes fueran identificados como ortovanadato sódico ( $\text{VO}_4\text{Na}_3$ ), acrecentó notablemente el interés de los investigadores por este tipo de compuestos.

El vanadio es un elemento incluido en el grupo de los metales de transición, cuyo número atómico es 23, su masa 50,942, su densidad 6,06 y su radio metálico 1,34 Å. Sus

compuestos pueden presentar distintos estados de oxidación - del elemento, desde  $V^{2+}$  hasta  $V^{5+}$ , dependiendo del número de electrones cedidos o compartidos de sus orbitales más externos. Este aspecto tiene considerable importancia ya que las acciones biológicas del vanadato, tales como bloquear la - - ATPasa, estimular la adenil-ciclasa o aumentar la fuerza de contracción miocárdica, se refieren fundamentalmente al vanadio en su estado de oxidación de  $+5$  (101, 104).

El ortovanadato sódico ( $V^{5+}$ ) es un potente inhibidor de la actividad de la bomba de sodio, incluso en concentraciones muy bajas, de rango nanomolar (13,105,106). Esta - inhibición es dependiente de la concentración de  $Mg^{2+}$  y  $K^+$  del medio, mientras que se reduce con altos niveles de sodio (13, 106). En estas circunstancias, tendentes al bloqueo de - la enzima, el  $Mg^{2+}$  y el  $K^+$  se unen a puntos de la misma distintos a aquellos en los que favorecen la actividad de la -- ATPasa (106). El bloqueo del vanadato es de carácter reversible (101) y se realiza por actuación sobre la cara interna, citoplasmática, de la enzima(107), diferenciándose así de los digitálicos que ejercen su efecto desde el lado extracelular (108). El ión vanadio puede unirse en dos puntos diferentes, de alta y baja afinidad (101, 109), y se ha propuesto que, - al menos en el lugar de fijación de alta afinidad, se comporta como un análogo estructural del ión fosfato, suplantándolo e inhibiendo las reacciones que incluyen la transferencia de grupos fosfato (13,101). En este sentido, se ha comproba-

do que el ortovanadato tiene una configuración molecular muy parecida a la del ión fosfato, y atraviesa la membrana de los hematíes merced al mismo mecanismo de transporte de aniones utilizado por éste (107). A diferencia de los glucósidos cardiotónicos, el vanadato no bloquea exclusivamente la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger} - \text{K}^{\dagger}$  dependiente, sino que también posee gran actividad como inhibidor de otros tipos de ATPasa, responsables del -- transporte de  $\text{Ca}^{2\dagger}$  (ATPasa  $\text{Ca}^{2\dagger}$  dependiente) o  $\text{Mg}^{2\dagger}$  (ATPasa  $\text{Mg}^{2\dagger}$  dependiente) (101, 110, 111).

La inhibición de la ATPasa por los compuestos de vanadio puede ser revertida casi en su totalidad con la adición de concentraciones milimolares de noradrenalina (13). Este efecto parece deberse a una interacción molecular entre ambos fármacos, independientemente de sus respectivos efectos sobre la bomba de sodio, formando complejos que posteriormente producen la oxidación de la noradrenalina y la reducción del vanadato, con la consiguiente inactivación biológica de ambos compuestos (112,113). El ácido ascórbico y otros agentes reductores, sin afectar los efectos de vanadato sobre la ATPasa, pueden prevenir estos procesos de óxido-reducción -- (113).

El hecho de que la bomba de sodio aislada sea poderosamente inhibida por los compuestos de vanadio, ha llevado a diversos investigadores a estudiar los efectos de estos -- agentes sobre la fuerza de contracción miocárdica, con el fin de establecer posibles analogías con los digitálicos. Los re

sultados obtenidos difieren sensiblemente según la especie; en rata y conejo el vanadato tiene efecto inotrópico positivo, tanto en aurícula como en ventrículo, mientras que en gato y cobayo sólo aumenta la fuerza de contracción del miocardio -- ventricular. En la aurícula de estos animales, por el contrario, el vanadato ejerce un claro efecto negativo sobre la fuerza de contracción (108, 109, 114, 115, 116, 117).

La acción inotrópica positiva de estos compuestos se ha intentado explicar, en primer lugar, como secundaria - al bloqueo de la ATPasa  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  dependiente, por analogía - con los cardiotónicos (108, 114). Sin embargo, en el cobayo, la sensibilidad al vanadato de la ATPasa obtenida de ventrículo es igual a la de aurícula (115), aunque es posible que - las células auriculares intactas sean incapaces de incorporar el ión vanadio en su forma inhibidora ( $\text{V}^{+5}$ ) a partir del medio extracelular (109, 118). Por otra parte, en células miocárdicas de rata, cultivadas, se ha demostrado un incremento de la incorporación de  $\text{Rb}^{86}$  (índice biológico de la actividad de la bomba de sodio) tras la exposición al vanadato (102), lo que coincide con cierta capacidad de este agente para estimular, aunque sólo sea transitoriamente, la ATPasa extraída de corazón de gato (119-120). Estos resultados no concuerdan, aparentemente, con la idea original que atribuye a este compuesto un efecto similar a los cardiotónicos.

El incremento de AMPc por estimulación de la adenilciclase ha sido otro mecanismo de acción propuesto para este

fármaco (116, 121). Sin embargo, la inhibición de la fosfo--  
diesterasa (enzima responsable del desdoblamiento de AMPc) -  
debería aumentar el efecto inotrópico positivo del vanadato,  
según tal hipótesis, hecho que no ha podido demostrarse expe-  
rimentalmente (122). Por último, cabe la posibilidad de que  
el vanadato altere la disponibilidad de  $Ca^{2+}$  superficial, ad-  
herido a la membrana, aunque de manera no completamente uni-  
forme, explicándose así tanto las acciones inotrópicas posi-  
tivas como las negativas (117).

Los efectos farmacológicos del vanadato no se limi-  
tan al miocardio, sino que afectan también a otros tejidos -  
de la economía. Este agente tiene una potente acción natriu-  
rética en ratas, tanto en el animal "in vivo" (123) como en  
el riñón aislado y perfundido (124), lo que se cree esté me-  
diado por inhibición de la ATPasa  $Na^{+} - K^{+}$  dependiente a ni-  
vel renal (124).

Los compuestos de vanadio inducen vasoconstricción,  
aparentemente por actuación directa sobre la pared vascular,  
ya que son capaces de originar esta clase de respuestas en -  
experimentos "in vitro" con vasos aislados (124, 125). Asi--  
mismo, pueden provocar contracciones en otros tipos de múscu-  
lo liso no vascular, como conducto deferente (126, 127), in-  
testino o músculo bronquial (128, 129). Este último hallazgo  
puede proporcionar una base fisiopatológica a los cuadros de  
bronquitis asmátiforme encontrados en intoxicaciones humanas  
por vanadio (129).

## MUSCULO LISO Y REGULACION DE LA BOMBA DE SODIO

La bomba de sodio influye activamente en el mantenimiento del gradiente electroquímico de las células musculares lisas (82). Los cambios en su actividad pueden originar alteraciones del potencial de membrana que se traducen en fenómenos de contracción o dilatación del lecho vascular (82). La omisión del potasio del medio extracelular induce una respuesta vasoconstrictora en arterias aisladas (56, 57, 78), - debido al bloqueo de la ATPasa (75, 80). Por el contrario, pequeños incrementos locales de la concentración de  $K^+$  disminuyen la resistencia al flujo sanguíneo en diversos lechos vasculares (130). En vasos aislados, con un tono contráctil - previo, la adición de potasio en bajas dosis produce una marcada vasodilatación (56, 131). Actualmente, se acepta de forma generalizada que este efecto está mediado por la estimulación que el potasio ejerce sobre la ATPasa  $Na^+ - K^+$  dependiente (130, 132).

Dado que algunos acontecimientos fisiológicos o fisiopatológicos, como el ejercicio o la isquemia miocárdica, producen una cierta liberación de  $K^+$  de las células musculares e incrementan la concentración local de este ión (130), se ha propuesto que al menos una parte de la vasodilatación que se produce en tales circunstancias puede ser debida a la estimulación de la bomba de sodio por el  $K^+$  (130, 133). Incluso se ha apuntado la posibilidad de que determinados compuestos endógenos, concretamente ciertas prostaglandinas de las



que se conoce su capacidad vasodilatadora, ejerzan tal acción a través de la estimulación directa de la bomba de sodio, potenciando los efectos vasodilatadores del potasio (134).

La relajación dependiente de potasio no se afecta por la denervación quirúrgica o química, por bloqueantes adrenergicos o colinérgicos, tetrodotoxina, anestésicos locales o cocaína (130). Es bloqueada, y con frecuencia transformada en contracción, por ouabaina, el frío (132) o la depleción extracelular de  $\text{Na}^+$  (130). Otros cationes monovalentes, como el rubidio o, en menor grado, el cesio o el amonio pueden sustituir al potasio en la inducción de estos efectos - (135, 136, 137). En base a tales hechos se ha considerado que la vasodilatación dependiente de potasio puede constituir un índice fiable sobre la actividad de la  $\text{ATPase Na}^+ - \text{K}^+$  a nivel del músculo liso vascular (132).

Por otro lado, en ratas con hipertensión determinada genéticamente se ha encontrado que la relajación dependiente de potasio es más acusada que en los controles (138). Al mismo tiempo se ha visto que la incorporación de  $\text{Rb}^{86}$  en la pared arterial se encuentra incrementada en este tipo de animales, mientras que está reducida en otros modelos experimentales de hipertensión (139). Como tanto la relajación dependiente de  $\text{K}^+$  como la incorporación de rubidio marcado reflejan la actividad de la  $\text{ATPase Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, estos datos apoyan la idea de que, al menos en determinados tipos de hipertensión, puede existir una hiperactividad de la bomba -

de sodio "in vitro" (138, 139, 140), lo que se debe posiblemente a una elevación del número de moléculas de ATPasa Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> dependiente por unidad de peso (141). Además, se ha evidenciado también que los digitálicos poseen un efecto muy -- acusado sobre los vasos de animales hipertensos, y antagonizan la incorporación de Rb<sup>86</sup> y la relajación K<sup>+</sup> - dependiente en mayor medida que en los controles (140, 141, 142, 143).

La posibilidad de que la ATPasa Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> y sus alteraciones puedan jugar un papel importante en la patogénesis de la hipertensión arterial se ha incrementado por el descubrimiento de sustancias endógenas capaces de desplazar a la ouabaina marcada de sus lugares de fijación (144) e inhibir la ATPasa de origen cardíaco (145, 146). Incluso, recientemente, se ha aislado en plasma y orina de sujetos hipertensos -- una sustancia de este tipo, cuya concentración se correlaciona significativamente con el grado de tensión registrado (147).

Al margen de su posible papel patogénico, la presencia de este tipo de antagonistas endógenos del receptor digitálico (la molécula de ATPasa), bautizados ya con el nombre de endodiginas, en analogía a lo sucedido con los opiáceos - endógenos (5), junto con otros agentes capaces de estimular - la bomba de sodio, potasio o prostaglandinas, han hecho considerar la hipótesis de que la modulación de la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> dependiente es un factor de regulación, tanto de la contractilidad cardíaca como del tono del lecho vascular (5).

Junto a estos mecanismos extracelulares, se ha especulado también con la existencia de moduladores de la bomba de sodio situados en el citoplasma. El descubrimiento de que el vanadato bloquea la ATPasa y de que constituye un contaminante habitual en las preparaciones comerciales de la enzima (13) ha señalado a este elemento como un posible regulador intracelular de la bomba de sodio (13, 101).

Las concentraciones tisulares de vanadio oscilan entre 0,3 y 1,0 micromoles, siendo particularmente elevadas en riñón y músculo esquelético (5, 13). Dada la alta capacidad inhibitoria de la ATPasa que posee el vanadato ( $I_{50}$  : 0,3 - 0,9 micromoles) (5), es posible que en circunstancias fisiológicas hasta un 50% de la actividad de la bomba está bloqueada por este elemento (5).

Por otra parte, se ha encontrado en sinaptosomas de cerebro de rata que la noradrenalina es capaz de estimular la ATPasa indirectamente, al antagonizar un factor citoplasmático que inhibe la enzima (148), factor que ha sido indentificado como vanadato (149). Con tales datos se ha propuesto éste como uno de los posibles efectos fisiológicos de las catecolaminas (148, 149). La formación de complejos entre el vanadato y noradrenalina podría justificar estas acciones en preparaciones aisladas de la ATPasa (113); sin embargo, la actuación exclusivamente intracelular de vanadato (107) hace muy improbable que la noradrenalina pueda antagonizarlo por el mecanismo citado (150). En este sentido parece más sugerente

como sistema controlador de la afinidad del vanadato por la enzima, la existencia de procesos intracelulares de óxido-reducción que, modificando el estado de oxidación del ión vanadio, regule el grado de inhibición de la bomba de sodio (101).

El hecho de que la ouabaina y el vanadato inhiban la ATPasa en puntos diferentes ha llevado a estudiar las posibles interacciones entre ambos fármacos. De este modo se ha observado que el vanadato estimula la fijación de la ouabaina marcada en miocardio de gato (119), y que la administración conjunta de estos dos agentes produce un incremento de la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  dependiente, purificada de riñón de perro, y un aumento en la fuerza de contracción en corazón de conejo (108). Tales resultados sugieren que la inhibición de la ATPasa miocárdica por el vanadato de origen endógeno puede ser un factor determinante, tanto en el estado contráctil del corazón como en su sensibilidad a los glucósidos cardíacos (108).

En el lecho vascular también es posible que el vanadato funcione como un modulador fisiológico de la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  dependiente, sobre la base de que este agente es capaz de inducir vasoconstricción tanto en animales "in vivo" como en vasos aislados (124, 125, 151). La ingesta crónica de sales de vanadio en ratas, aunque no produce por sí misma aumentos de la presión arterial, parece incrementar la reactividad de los vasos a las catecolaminas circulantes (152).

En resúmen, parece ser que la bomba de sodio tiene un importante papel en el mantenimiento del tono vascular. - Posiblemente la actividad de la enzima en cada tipo de vaso sea uno de los sistemas reguladores del grado de contracción de los distintos lechos vasculares, lo que a su vez explicaría las variadas respuestas y mecanismos de acción de los -- bloqueantes de la ATPasa en los diversos vasos estudiados -- (57, 62, 77, 91). Por otra parte, el estudio de los efectos de estos fármacos en los vasos cerebrales posee un interés - fisiológico y clínico adicional, así como una mayor complejidad, dadas las características especiales del lecho cerebrovascular (62, 153). Por ello, los trabajos acerca de la relación entre la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger} - \text{K}^{\dagger}$  dependiente y el flujo cerebral revisten una particular importancia, teniendo en cuenta, además, las pocas referencias que existen en la bibliografía sobre este tema.

OBJETIVOS

Este trabajo pretende analizar comparativamente el efecto de la ouabaina y los compuestos de vanadio (fármacos bloqueantes de la bomba de sodio) en arterias cerebrales de gato, tanto a nivel de la contracción vascular como de la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares. Con objeto de comprobar si el comportamiento de la ATPasa vascular cerebral presenta propiedades similares a la de los vasos periféricos, se estudiará simultáneamente el efecto de estos fármacos en arterias femorales del mismo animal. Para ello, se investigarán los aspectos reseñados en los siguientes apartados:

- 1º.- Se evaluará el efecto que sobre el tono basal de segmentos de arterias cerebrales y femorales de gato producen la ouabaina y diversos compuestos de vanadio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ;  $\text{VO}_4\text{SO}_4$ ;  $\text{ClV}_3$ ;  $\text{V}_3\text{O}_5$ ), mediante la realización de las correspondientes curvas dosis-respuesta.
- 2º.- Se analizará la influencia de los receptores alfa-adrenérgicos en la posible contracción originada por estos agentes en ambos tipos de vasos. Para ello, se comprobarán los efectos que la administración de fentolamina y el pre

tratamiento de los animales con reserpina producen en la respuesta inducida por ouabaina y vanadato sódico.

- 3º.- Se estudiará el papel del calcio extracelular en la hipotética vasoconstricción evocada por ouabaina y vanadato. Con este objeto, las arterias cerebrales y femorales de gato se introducirán en un medio carente de dicho ión, y posteriormente se añadirán los citados fármacos. Por otro lado, se comprobará el efecto que tiene el bloqueo de los canales de calcio voltaje-dependientes con verapamil en la respuesta ocasionada por estos agentes.
- 4º.- Se investigarán las consecuencias de la administración conjunta de ouabaina y vanadato en la tensión desarrollada por las arterias cerebrales y femorales, a fin de analizar las posibles interacciones existentes entre las respuestas producidas por estos dos fármacos.
- 5º.- Se estudiará la influencia de la reducción de la concentración extracelular de sodio en las arterias cerebrales y femorales de gato, así como la repercusión de esta disminución en las curvas dosis-respuesta a ouabaina y vanadato.
- 6º.- Se evaluará el efecto de la supresión de potasio en el medio sobre el tono vascular. Además, en estas condiciones, se contraerán las arterias cerebrales y femorales de gato con noradrenalina, y posteriormente se investigará la capacidad del potasio en bajas concentraciones pa-



ra producir una respuesta vasodilatadora. Asimismo, se comprobarán las acciones de ouabaina y vanadato en este tipo de respuesta.

- 7<sup>º</sup>.- Se estudiará la posible liberación de noradrenalina inducida por ouabaina y vanadato en arterias cerebrales de gato. Con esta finalidad, los vasos se incubarán en un medio con  $H^3$ -noradrenalina, y a continuación se medirá la cantidad de tritio secretada tras la exposición de los tejidos a los citados fármacos.
- 8<sup>º</sup>.- Se analizará la dependencia de esta posible liberación de la presencia de calcio extracelular, utilizando dicho parámetro como indicativo del carácter excitotico de la secreción del neurotransmisor.
- 9<sup>º</sup>.- Se investigará el efecto de la reducción de la concentración extracelular de sodio en la liberación de  $H^3$ -noradrenalina producida por ouabaina o vanadato en arterias cerebrales y femorales de gato. Esto se hará con el propósito de averiguar la posible participación del sistema de intercambio  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  en dicha secreción.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se han utilizado como animales de experimentación gatos de ambos sexos (1,5 a 4 Kgs. de peso), que fueron proporcionados por el Parque de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los animales fueron sacrificados mediante la administración de pentobarbital sódico (35mg/Kg) y posterior sangría por sección de la carótida. A continuación se les extrajo rápidamente el cerebro y las arterias femorales y se introdujeron inmediatamente en una solución Krebs-Hanseleit (K-H) mantenida a 4°C. A continuación se disecaron cuidadosamente las arterias de la base del cerebro (polígono de Willis y sus ramificaciones), cuya disposición anatómica está esquemáticamente representada en la Fig. (1).

#### Estudios de reactividad arterial

Para analizar la contracción de las arterias cerebrales y femorales se utilizaron segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud, los cuales se colocaron en una copa adecuada para órganos aislados, que contenía 6 ml de solución K-H a 37°C y con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, lo que daba a la solución un pH final de 7,3 - 7,4 (Fig. 2).

Para registrar la contracción isométrica de los cilindros arteriales se utilizó el método de Nielsen y Owmán (154), que consiste en introducir dos alambres muy finos, 150 micrómetros de diámetro, pero rígidos en la luz del

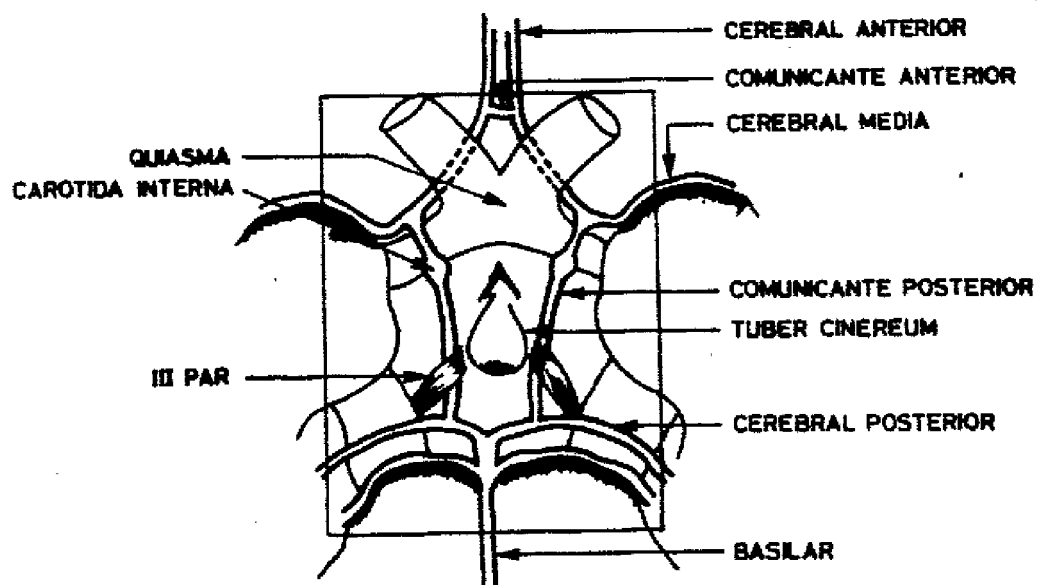


Fig. 1: Representación esquemática de las arterias situadas en la base del cerebro de gato.

segmento vascular; uno de ellos permanecía fijo en la parte inferior del baño, mientras que el otro se desplazaba paralelamente al anterior, y se encontraba unido a un transductor de fuerza (Grass FT 03C), conectado a su vez a un polígrafo (Grass tipo 7D Polygraph) (Fig. 2). A los cilindros arteriales se les aplicó una tensión inicial de 0,5 g en el caso de las arterias cerebrales y de 1 g en las femorales, que se -- fué reajustando cada 15 min hasta que quedó estabilizada, lo que sucedió habitualmente transcurridos 90 min.

Una vez estabilizada la tensión basal se comenzó -- la administración, en intervalos de 5 min, de dosis crecientes y acumulativas de los fármacos objeto de estudio, ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) y diversos compuestos de vanadio, tales como vanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ;  $V_{\uparrow 5}$ ), sulfato de vanadio ( $\text{VO SO}_4$ ;  $V_{\uparrow 4}$ ), cloruro de vanadio ( $\text{Cl}_3\text{V}$ ;  $V_{\uparrow 3}$ ) y óxido de vanadio -- ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ;  $V_{\uparrow 5}$ ), todos ellos a dosis que oscilaron entre  $10^{-7}$  y  $10^{-3}$  M, obteniéndose las correspondientes curvas dosis-respuesta. En algunos experimentos se añadieron simultáneamente ouabaina y vanadato sódico en concentraciones crecientes, con el fin de averiguar las posibles interacciones entre ambos.

La adición de fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M) y verapamil -- ( $3 \times 10^{-6}$  M), para analizar su influencia sobre los efectos de ouabaina y vanadato, se hizo 10 min antes de añadir estos -- fármacos. La reserpinización de algunos gatos se efectuó me diante la administración intraperitoneal de 2,5 mg de reser-pina por Kg de peso, 48 y 24 horas antes de sacrificar los

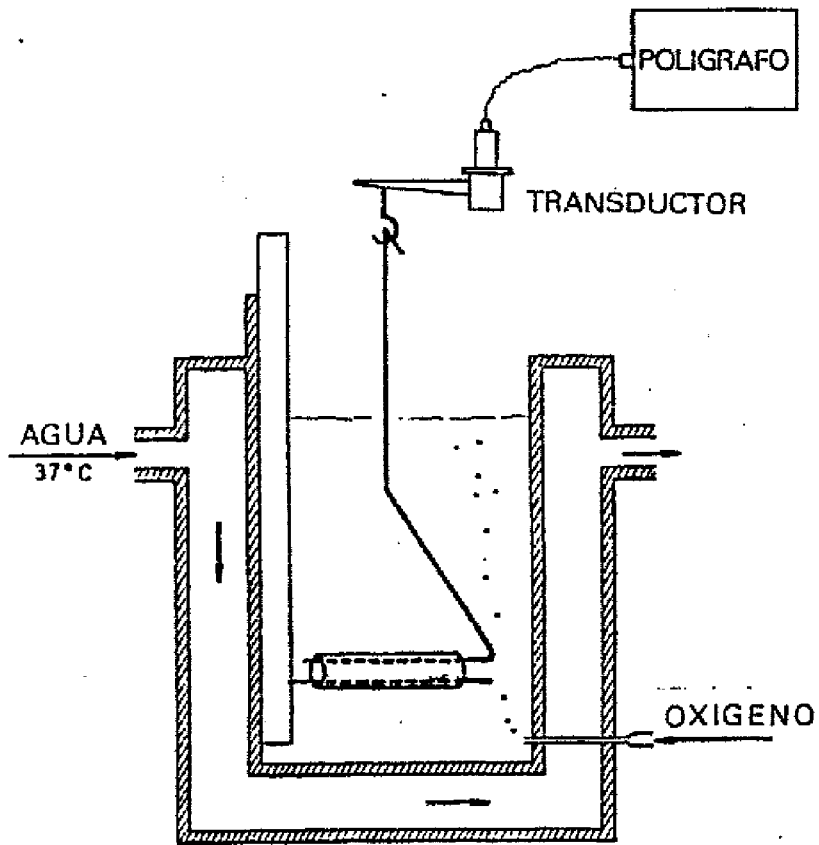


Fig. 2: Esquema de la preparación experimental para el estudio de la contracción isométrica de los segmentos vasculares.

animales.

Por último, se estudió la influencia de un medio carente de  $K^+$  en la respuesta contráctil inducida por noradrenalina  $10^{-5}M$  en segmentos de arterias cerebrales y femorales de gato, y el efecto de la readición de potasio sobre dicha respuesta, así como las modificaciones que en todos estos fenómenos ocasionan la ouabaina o el vanadato.

Las modificaciones de la concentración de determinados iones en el medio extracelular (medios carentes de  $Ca^{2+}$  o  $K^+$  y bajo en  $Na^+$ ) se consiguieron sustituyendo la solución Krebs-Hanseleit original por otras en la que se habían realizado las correspondientes alteraciones.

### Liberación de $H^3$ - Noradrenalina

Una vez extraídas las arterias cerebrales y femorales de gato y colocadas en una cápsula de Petri a 4° C, se les extrajeron cuidadosamente, con unas pinzas, los coágulos de sangre, se introdujeron en unas redecillas de nylon preparadas al efecto y se colocaron en un vial con solución K-H oxigenada a 37° C durante 15 min. para conseguir su adaptación a este medio.

Posteriormente se trasladaron a otro vial con 5 ml de K-H que contenía noradrenalina tritiada ( $H^3$ -NA) ( $2 \times 10^{-7}$  M; actividad específica 9 Ci/mmol); en dicho medio permanecieron durante 60 min. La solución estuvo permanentemente burbujeada con una mezcla de 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$  y mantenida a una temperatura constante de 37° C. Después del período de incubación las arterias se situaron en camaritas de material plástico a través de las cuales se perfundieron 0,5 ml de solución K-H por minuto, por medio de una bomba de perfusión Harvard Instruments. Asimismo, se hizo pasar una corriente continua de la mezcla gaseosa antes citada. Los primeros 100 min de perfusión se destinaron a lavar el exceso de  $H^3$ -NA retenido en forma no específica por los tejidos. Transcurrido ese tiempo se obtuvo un flujo de tritio estable, el cual fué tomado como secreción basal.

A partir de este momento se utilizó la siguiente metodología:

1°.- En dos viales dispuestos al efecto se recogió el flujo -



perfundido en periodos sucesivos de 3 min, a fin de de--  
terminar la liberación espontánea de radioactividad (co  
mo el volumen de perfusión fué de 0,5 ml/min a lo largo  
de todo el experimento, la cantidad recogida en cada --  
vial fué de 1,5 ml ).

2º.- Seguidamente se añadió al medio de perfusión el fármaco  
estudiado, ouabaina ( $10^{-4}M$ ) o vanadato sódico ( $10^{-3}M$ ) y  
se fué recogiendo el efluente en viales durante periodos  
de 3 min en un tiempo total de 30 min.

3º.- De cada vial se extrajeron 0,5 ml del efluente, a los -  
que se añadieron 2 ml de líquido de Bray, con objeto de  
medir la radioactividad liberada en un contador de cen-  
telleo para líquidos Nuclear Chicago, modelo ISOCAP 300.

4º.- En los casos en que se modificaron las concentraciones  
iónicas del líquido nutricio (medio bajo en  $Na^+$  o caren-  
te de  $Ca^{2+}$ ) la solución correspondiente comenzó a per--  
fundirse 10 min antes de iniciarse la administración de  
ouabaina o vanadato.

#### Composición de las soluciones utilizadas

La composición de la solución de Krebs-Hanseleit, expre-  
sada en milimoles fué la siguiente:

CLNa .....	119	SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O .....	1,2
ClK .....	4,6	CO <sub>3</sub> HNa .....	25
Cl <sub>2</sub> Ca .....	2,5	Glucosa .....	11,1
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	1,2	EDTA-Na .....	0,01

La adición de EDTA se hizo con objeto de reducir la oxidación de los grupos catecol.

La composición de la solución exenta de calcio fué idéntica a la reseñada, pero en esta ocasión se omitió el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y se añadió EGTA 1 mM. Para la obtención de la solución libre de potasio se procedió de manera análoga, suprimiendo la administración de  $\text{ClK}$  y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  en su elaboración.

El líquido nutricio con bajo contenido en  $\text{Na}^+$  (11.9 mM) tuvo, sin embargo, una composición diferente (mM) (75 ):

$\text{ClK}$ .....	5.4	$\text{CO}_3\text{HNa}$ .....	11.9
$\text{Cl}_2\text{Ca}$ .....	2.5	Glucosa .....	5.5
$\text{Cl}_2\text{Mg}$ .....	1.0	Sacarosa .....	273.6

La sacarosa se añadió con objeto de mantener la osmolaridad dentro de los rangos fisiológicos. Al ser ésta solución distinta a la empleada en condiciones normales, se comprobó previamente a su uso que, excepto la reducción de  $\text{Na}^+$ , ninguna de estas variaciones tuvo efectos significativos en la contractilidad de los segmentos arteriales o en la liberación de  $\text{H}^3\text{-NA}$ .

Las soluciones de ouabaina ( $6 \times 10^{-2}$  M) y de los diferentes compuestos de vanadio (todos ellos  $6 \times 10^{-2}$  M) se hicieron en agua destilada y el mismo día de su utilización. La fentolamina ( $6 \times 10^{-3}$  M) se disolvió también en agua destilada y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  entre cada experimento. La solución original de verapamil ( $10^{-3}$  M) se efectuó en etanol absoluto, almacenándose igualmente a  $-20^\circ\text{C}$ . Tanto la ouabaina como el

verapamil se protegieron de la exposición a la luz en su preparación y durante los experimentos.

En los casos en que se añadió al baño noradrenalina y vanadato, en forma simultánea, se administró también ácido ascórbico (1 mM) para prevenir la formación de complejos entre ambos agentes.

La composición de líquido de centelleo (155) fué la siguiente (para 1 litro):

Naftaleno .....	60 gr.	Metanol .....	100 ml
PPG .....	4 gr.	Etilénglicol .....	20 ml
PDPOP .....	0,2 gr	Dioxano (dietilén dióxido)	
		..... hasta 1 litro.	

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo de acuerdo con el método de Snèdecor y Cochran (156).

Para la determinación de la significancia estadística se usó la t de Student, y se tomó el valor de  $P \leq 0,05$  como significativo. Los cálculos de porcentajes, medias, errores standard y t de Student se hicieron mediante programas de la firma Hewlett-Packard para el modelo de calculadora HP-97.

### Productos utilizados

En este trabajo se utilizaron una serie de fármacos y reactivos, la mayoría de los cuales se reseñan a continua-

ción. El resto de los productos convencionales empleados fueron siempre de la máxima pureza:

- Dubaina, octahidrato (Sigma).
- Vanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (Sigma).
- Sulfato de vanadio ( $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck).
- Cloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ) (Merck).
- Oxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ) (Merck).
- Verapamil, clorhidrato (Knoll).
- Fentolamina, clorhidrato (Ciba-Geigy).
- EDTA (Sigma).
- Noradrenalina tritiada, clorhidrato (Radiochemical Centre, Amersham).
- Noradrenalina, bitartrato (Sigma).
- EGTA (Sigma)
- Reserpina (Sigma).
- Glucosa (Merck)
- Sacarosa (Merck)
- $\text{ClNa}$ ,  $\text{ClK}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ,  $\text{CO}_3\text{HNa}$  (Merck).

RESULTADOS

## ESTUDIOS DE CONTRACTILIDAD

### Efecto de ouabaina sobre la reactividad de arterias cerebrales de gato

La ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) indujo un aumento significativo de la contractilidad en arterias cerebrales aisladas de gato (Fig. 3). Dicho efecto contráctil comenzó a la concentración de  $10^{-7}$  M y alcanzó su respuesta máximo a  $10^{-6}$  M. Además, se observó que, independientemente de la dosis administrada, el fármaco precisó 4 ó 5 minutos para ejercer dicha acción en toda su intensidad, y que a partir de ese momento se inició la relajación de los segmentos arteriales hasta recuperar la tensión basal (Fig. 3). La duración total de estos fenómenos, vasoconstricción y posterior dilatación, fué aproximadamente de 15 minutos, y no se vió alterada por el incremento de la concentración (Fig. 3). La adición de dosis crecientes y acumulativas del digitálico cada 5 min produjo un incremento de la contracción hasta  $3 \times 10^{-6}$  M y a partir de dicha concentración las arterias comenzaron a relajarse hasta alcanzar el tono basal a  $10^{-3}$  M (Fig. 4).

La administración de fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M, 10 min antes de añadir la ouabaina) o la reserpinización de los animales no produjeron cambios estadísticamente significativos en la curva dosis-respuesta a ouabaina (Figs. 5 y 6). Por el contrario, el verapamil ( $3 \times 10^{-6}$  M, igualmente 10 min antes de administrar el digitálico), un conocido antagonista de los

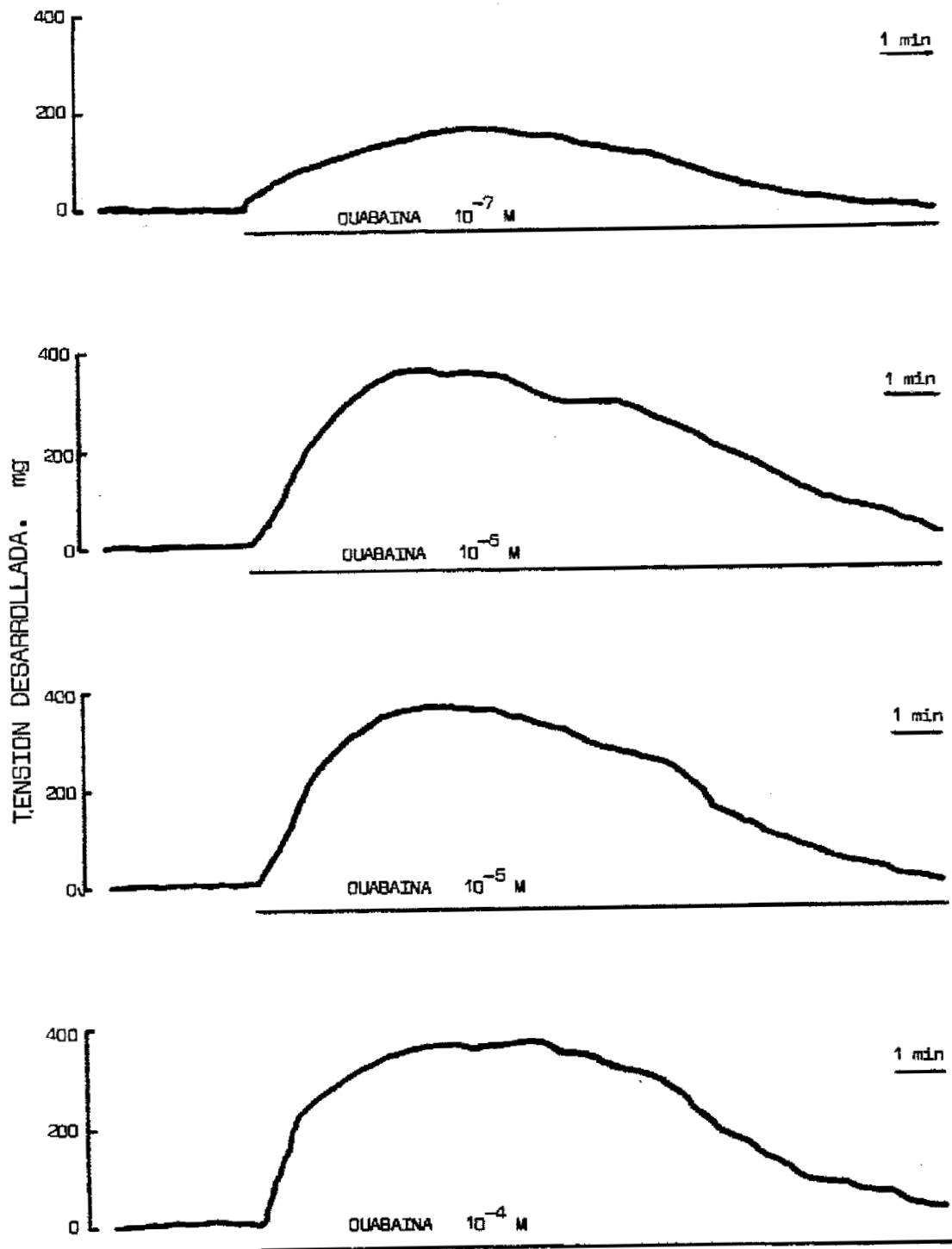


Fig. 3: Efecto contráctil de diversas dosis de oubaina ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$ ) en segmentos cilíndricos de arterias cerebrales de gato. La figura muestra algunos casos representativos. En abscisas se indica la tensión desarrollada en mg y en ordenadas el tiempo transcurrido (total 15 min) El periodo de exposición a la oubaina está representado por la raya horizontal.

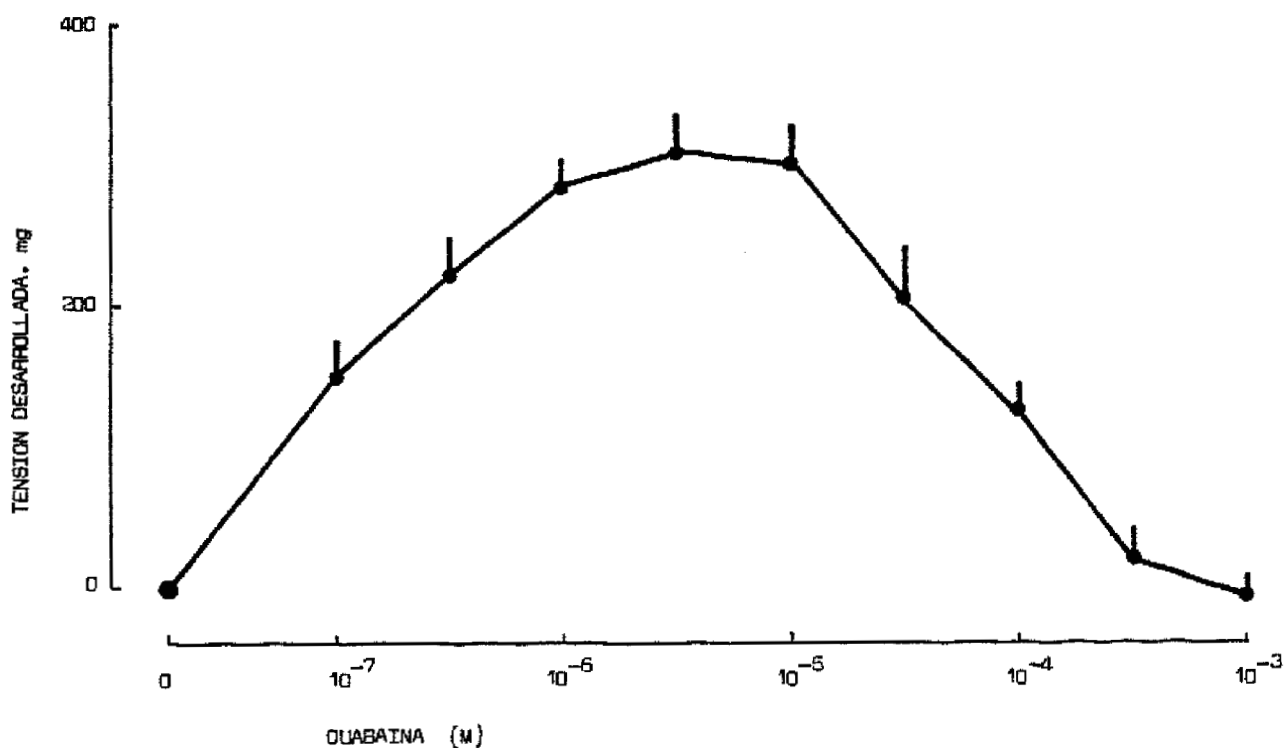


Fig. 4: Curva dosis-respuesta a ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ M) en arterias cerebrales de gato. En abscisas se indican las sucesivas concentraciones del digitálico, administradas en forma -creciente y acumulativa cada 5 min. En ordenadas está repre-sentada la contracción alcanzada en mg. Los puntos corresponden a la media aritmética de la contracción y las líneas verticales el error estándar de la media. El número de experi-mentos realizado fué de 13. La relajación que se obtuvo a --partir de la concentración de  $10^{-5}$  M de ouabaina dependió ex-clusivamente del tiempo transcurrido desde la primera dosis del fármaco.



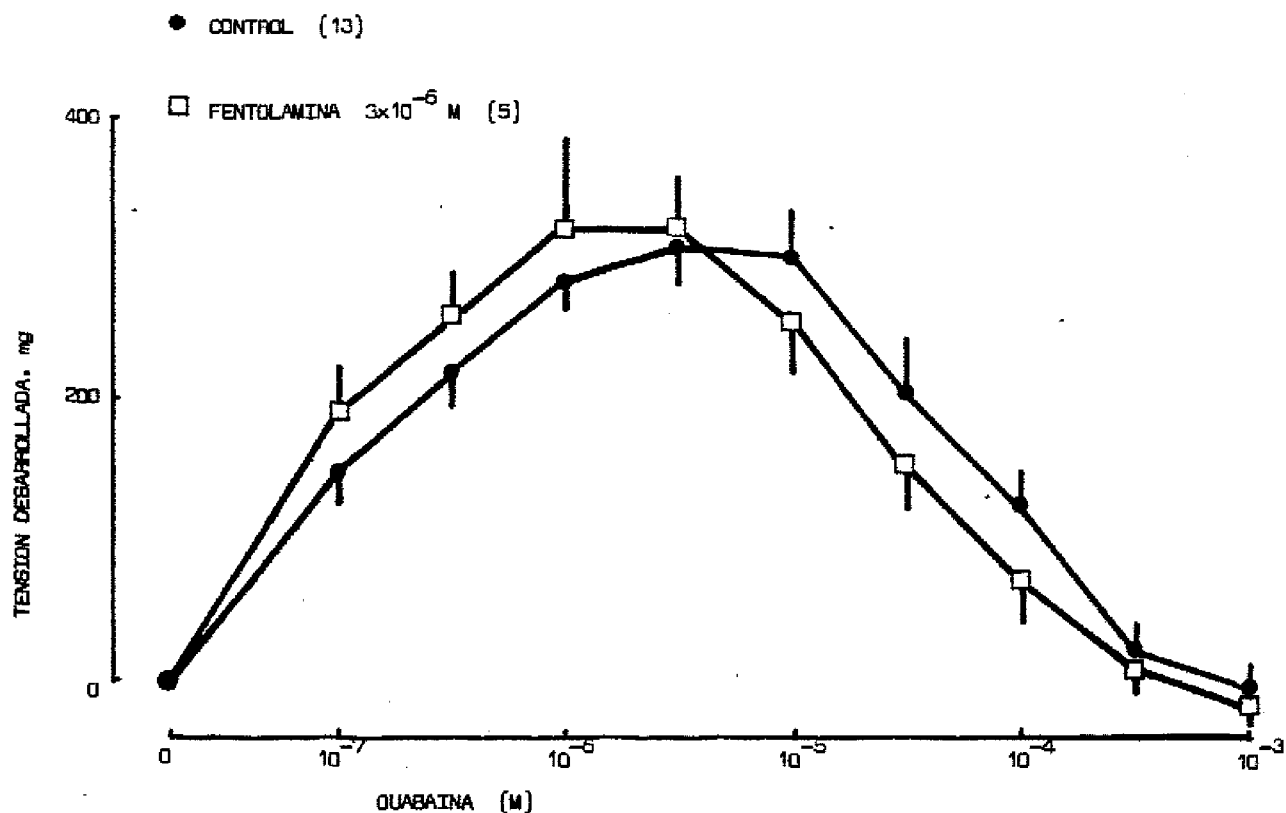


Fig. 5: Curva dosis respuesta a ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en - arterias cerebrales de gato, y efecto de fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M) sobre la misma. En ordenadas está representada la tensión desarrollada en mg por los cilindros arteriales, mientras en ordenadas se muestra la concentración del fármaco empleada en cada momento. Entre las sucesivas administraciones del digitálico transcurrieron 5 min.

La fentolamina se añadió al baño 10 min antes de iniciarse la curva. Los puntos indican la media aritmética de la contracción alcanzada, y los trazos verticales el error standard de la media. Entre paréntesis está el número de experimentos realizados.

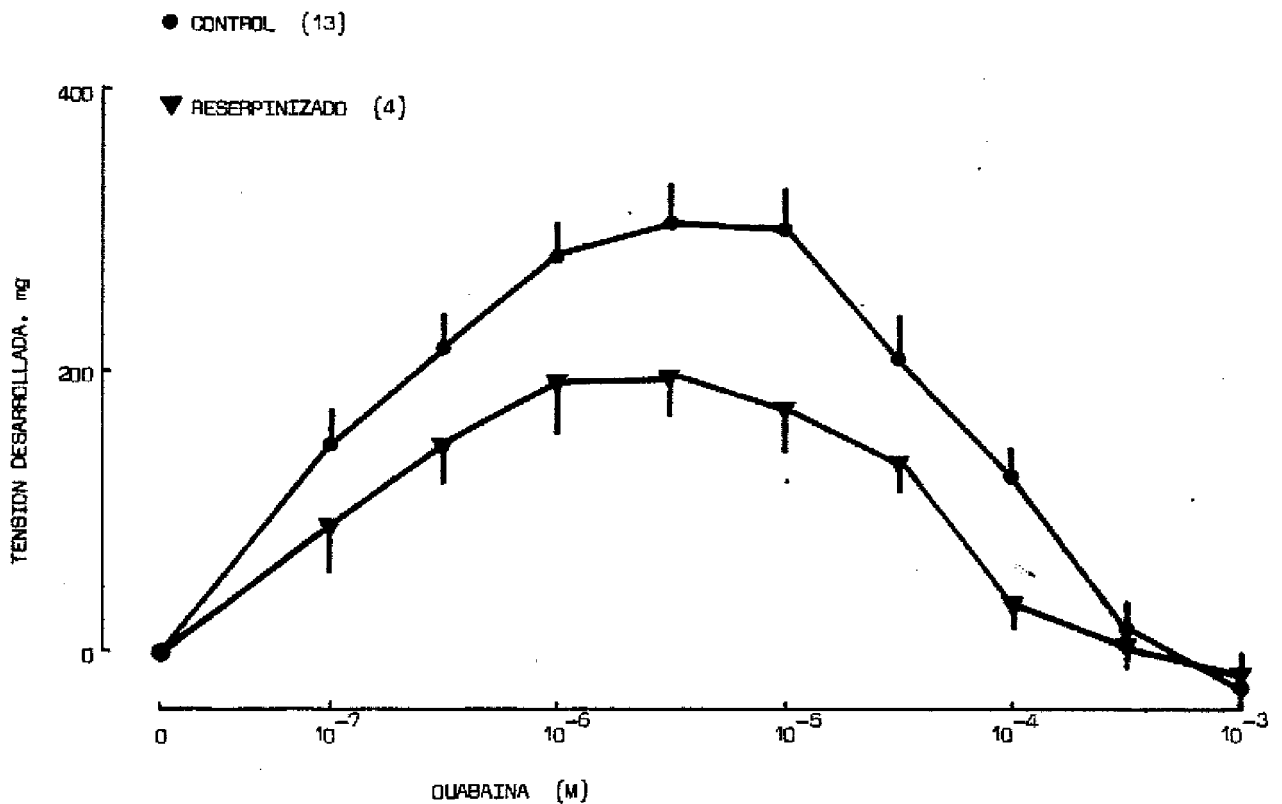


Fig. 6: Efecto de la reserpinización sobre la respuesta vasoconstrictora inducida por ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ M) en arterias cerebrales de gato.

La contracción alcanzada se representa en ordenadas y la concentración de ouabaina en abscisas. Entre cada dosis de fármaco transcurrieron 5 min. Los símbolos utilizados son análogos a los de la Fig. 4. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados.

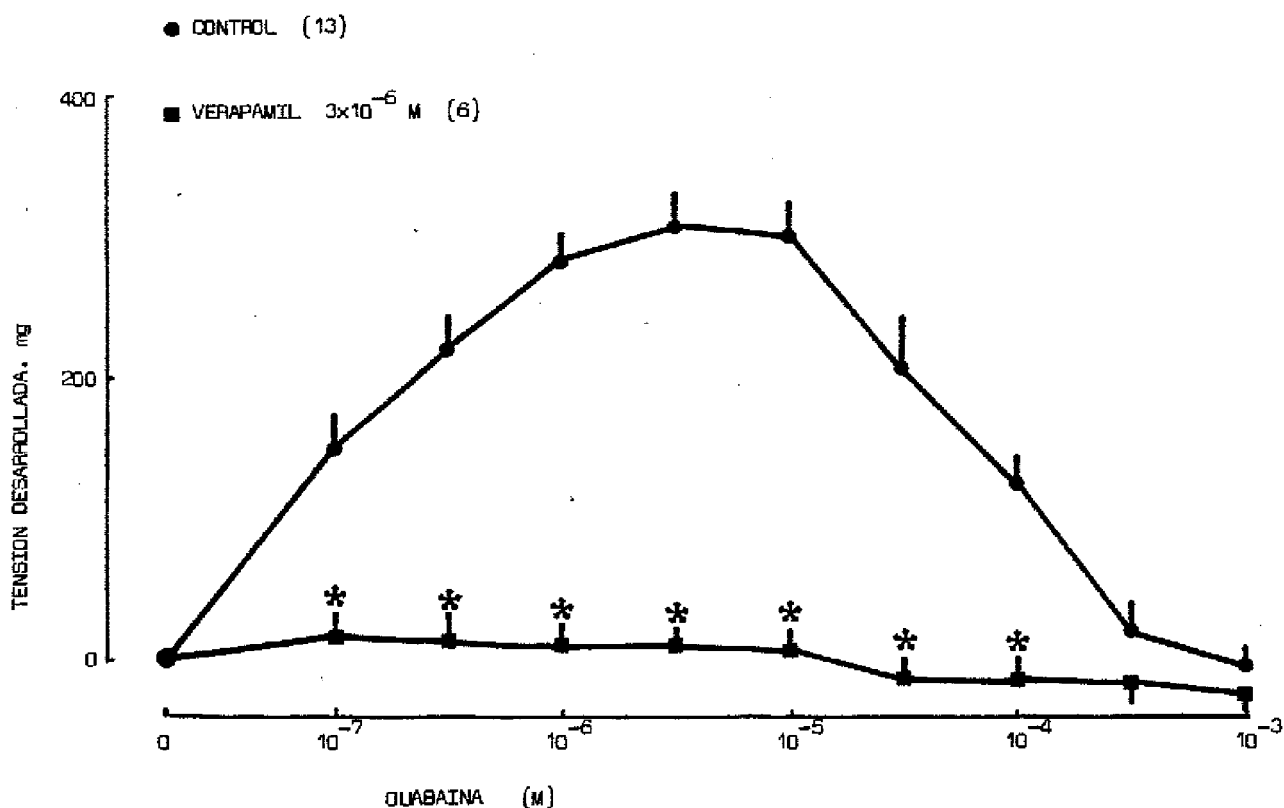


Fig. 7: Influencia de verapamil ( $3 \times 10^{-6}$ M) en la respuesta vasoconstrictora inducida por ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en segmentos de arterias cerebrales de gato. El verapamil se añadió 10 min antes de la administración del cardiotónico. Entre las sucesivas dosis acumulativas se dejó pasar un tiempo de 5 min. La contracción alcanzada se representa en ordenadas. La metodología y los símbolos usados son los mismos de las figuras anteriores. Los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

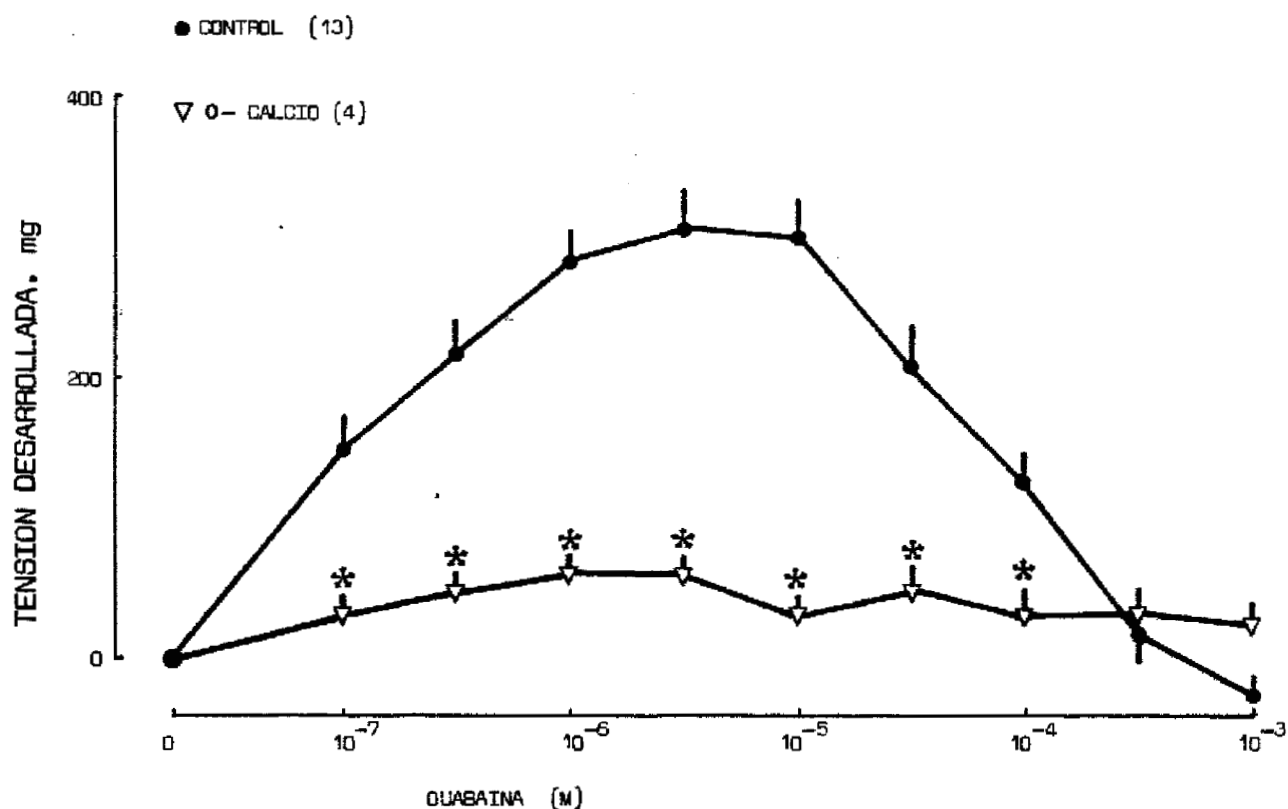


Fig.8: Efecto de la supresión del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre la curva dosis-respuesta a ouabaina en arterias cerebrales de gato. La supresión del calcio se realizó 30 min antes de iniciarse la curva. La metodología y los símbolos utilizados se explican en las gráficas anteriores. Los asteriscos indican la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ). Entre paréntesis el número de experimentos realizados.

canales de calcio, abolió por completo la contracción evocada por ouabaina en arterias cerebrales de gato, incluidas -- las obtenidas con las concentraciones más elevadas de este fármaco (Fig. 7).

Por otro lado, se comprobó que la respuesta vasoconstrictora ocasionada por la ouabaina en este tipo de vasos fué completamente dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, puesto que la supresión de los mismos produjo una ausencia de respuesta a cualquier concentración de ouabaina estudiada (Fig. 8), y su readición restauró la capacidad vasoconstrictora del digitálico (resultados no mostrados).

Efectos contráctiles de ouabaina sobre arterias femorales de gato

La administración de dosis crecientes de ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) produjo una elevación del tono contráctil en segmentos aislados de arterias femorales de gato que fué dependiente de la dosis (Figs. 9, 10). No se consiguió establecer el tope máximo de la respuesta contráctil inducida por ouabaina en este tipo de vasos.

En algunos casos, cuando la contracción inducida - por  $10^{-4}$  M de ouabaina quedó estabilizada se añadió al baño - fentolamina ( $10^{-6}$  ó  $3 \times 10^{-6}$  M), lo que produjo una clara disminución del tono de la pared arterial (Fig. 9). Cuando el - bloqueante alfa-adrenérgico ( $3 \times 10^{-6}$  M) se administró 10 min antes de comenzar la curva dosis-respuesta al cardiotónico la respuesta vasoconstrictora de las arterias femorales decreció de manera apreciable, aunque tal efecto sólo se puso de manifiesto a partir de la concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M de ouabai na. Además, incluso entonces persistió un componente vasocong trictor resistente a la acción bloqueante alfa-adrenérgica - (Fig. 11).

Sin embargo, la reserpinización de gatos originó - la práctica abolición de la contracción inducida por el digi tálico en las arterias femorales, en todas las concentracio nes empleadas (Fig. 12).

La presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular fué necesaria pa-

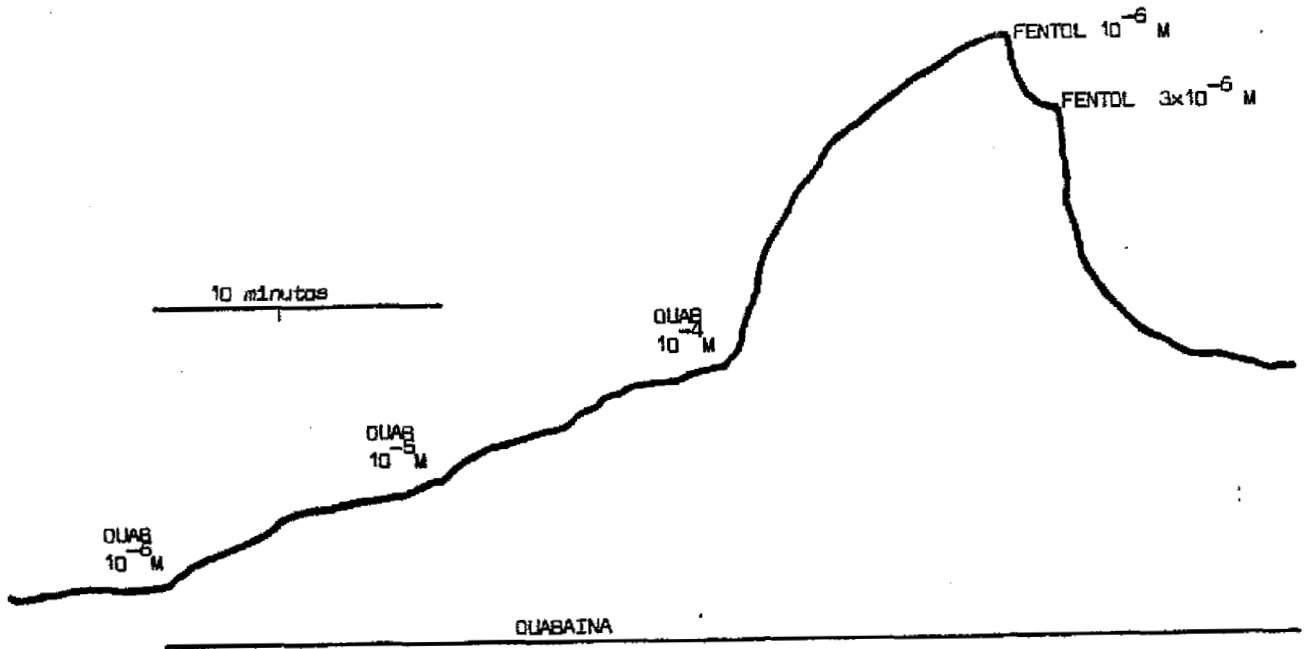


Fig 9: Caso modelo representativo de la acción vasoconstrictora de ouabaina en arterias femorales de gato. En ordenadas se indica la intensidad de la contracción alcanzada en mg, mientras en abscisas puede apreciarse el tiempo transcurrido. El trazo horizontal señala el periodo de estimulación con ouabaina. Cuando la vasoconstricción llegó a un punto estable se añadió fentolamina ( $10^{-6}$  y  $3 \times 10^{-6}$  M). El experimento completo tuvo una duración total de 40 min.

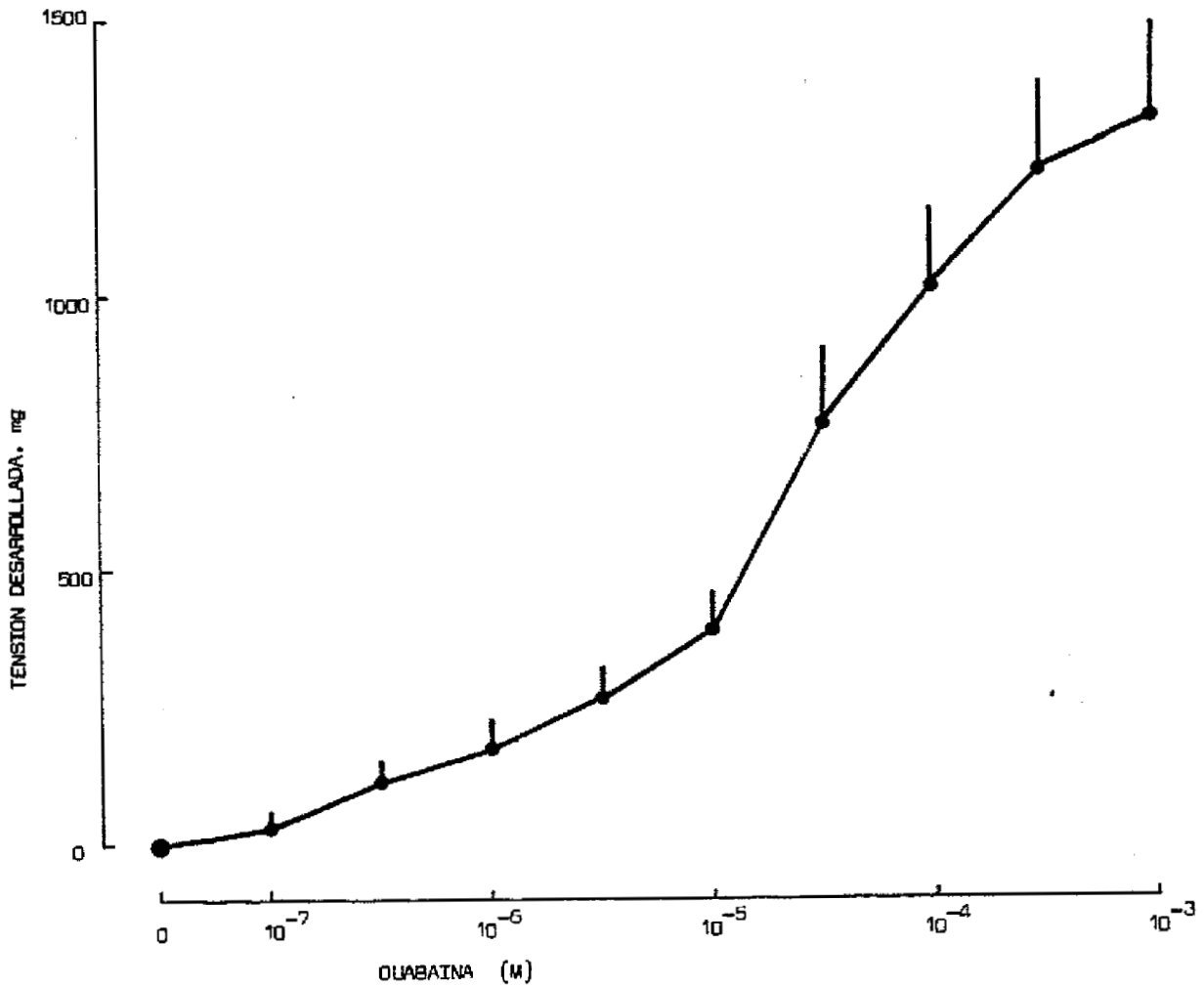


Fig. 10: Curva dosis-respuesta a ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias femorales de gato. La concentración del fármaco se indica en abscisas y la tensión alcanzada en ordenadas. El cardiotónico se añadió a intervalos de 5 min. Los puntos representan la media aritmética de la vasoconstricción desarrollada y las barras verticales el error estándar de la media. Para confeccionar esta figura se realizaron 19 experimentos.



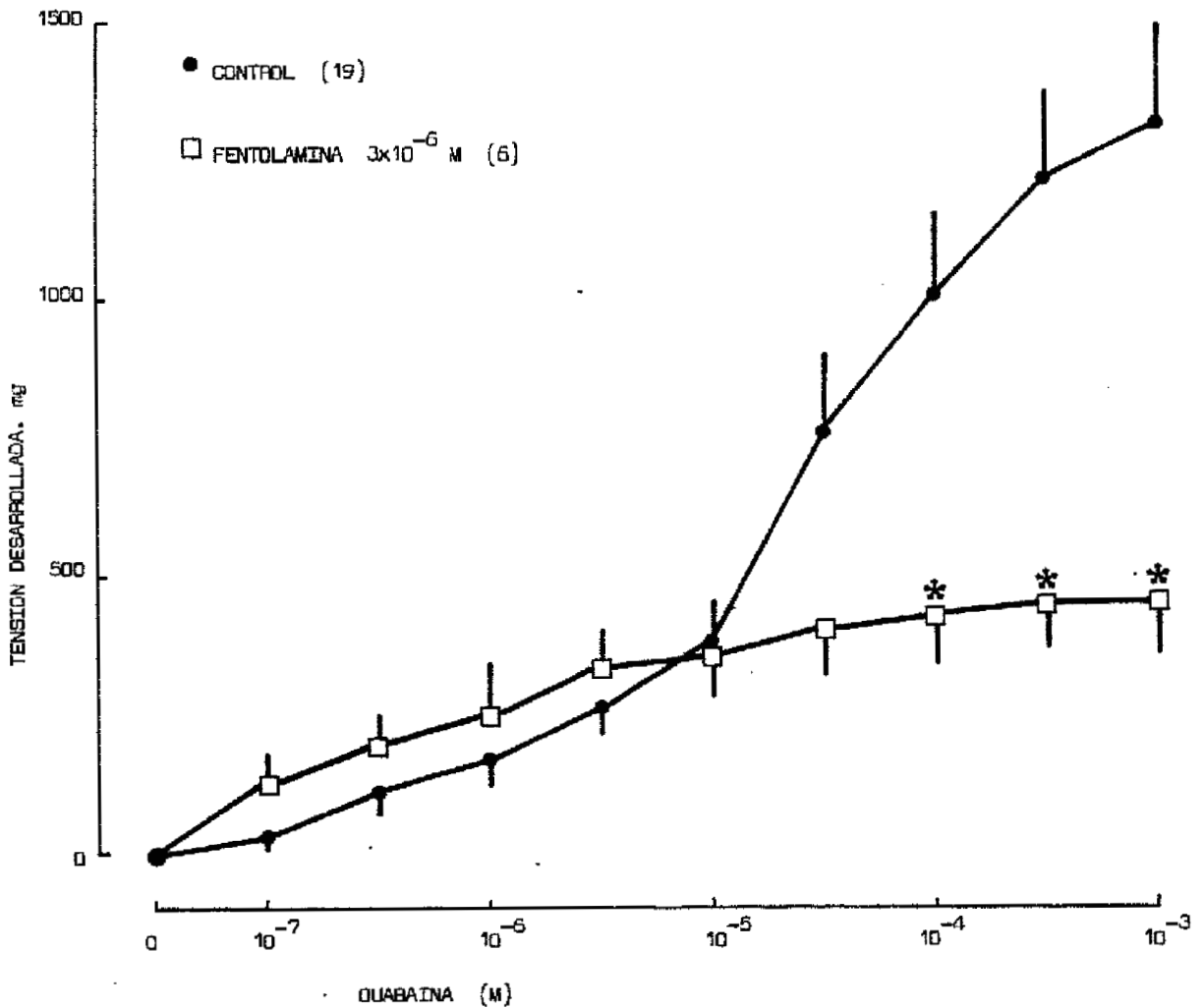


Fig. 11: Efecto de fentolamina ( $3 \times 10^{-6} M$ ) sobre la curva dosis-respuesta a ouabaina en arterias femorales de gato. La contracción alcanzada está representada en ordenadas y en abscisas la concentraciones de ouabaina en cada punto, igualmente administrada tras intervalos de 5 min. La fentolamina se añadió 10 min antes de comenzar la curva. Los símbolos utilizados son análogos a los de la figura anterior. Los experimentos realizados se indican entre paréntesis. Los asteriscos señalan la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

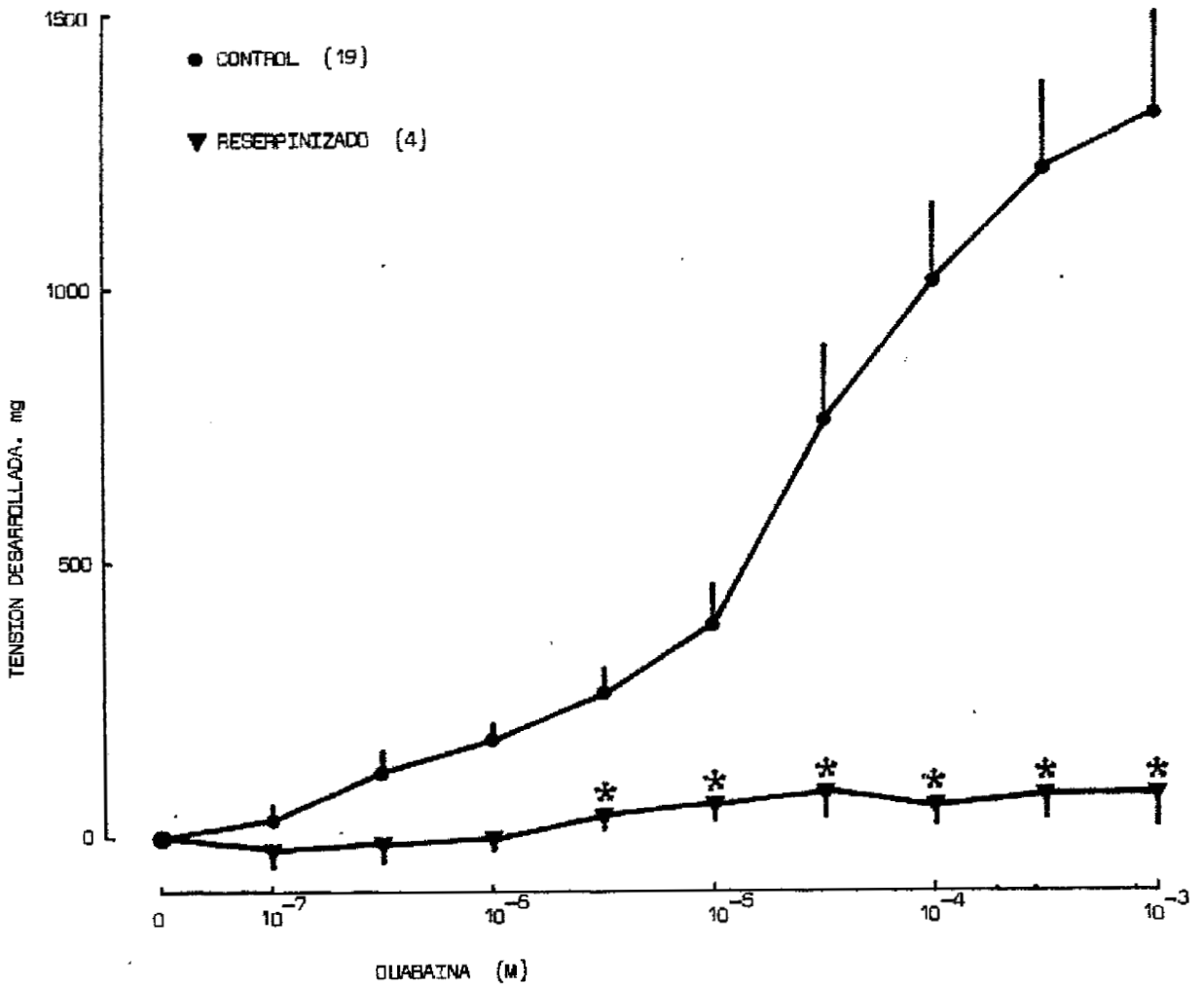


Fig. 12: Efecto del pretratamiento de los animales con reserpina en la respuesta de las arterias femorales a la ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ M). La metodología y los símbolos empleados son similares a los de las figuras anteriores. Los números entre paréntesis representan los experimentos realizados. Los asteriscos indican la presencia de significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

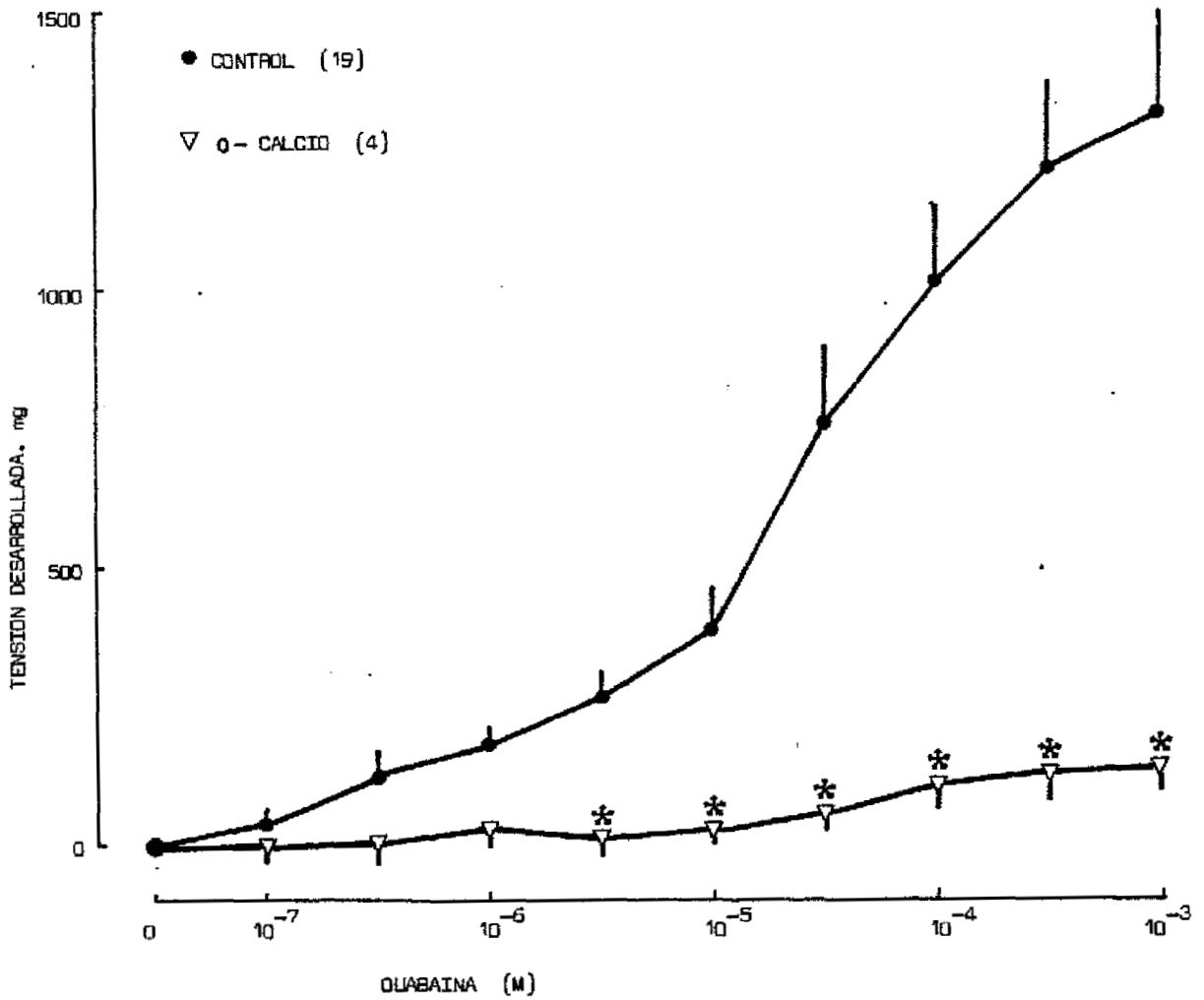


Fig. 13: Efecto de la omisión de calcio del medio sobre la respuesta de las arterias femorales de gato a ouabaina - - ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M). La omisión del  $Ca^{2+}$  extracelular se efectuó 30 min antes del inicio de la curva. La contracción, medida en mg, puede apreciarse en ordenadas, mientras que la concentración del fármaco se representa en abscisas. Entre cada dosis de este último transcurrieron 5 min. Entre paréntesis figura el número de experimentos realizados. Los puntos corresponden a la media de la contracción y las barras verticales el error standard de la media. La significación estadística está representada por los asteriscos ( $p \leq 0,05$ ).

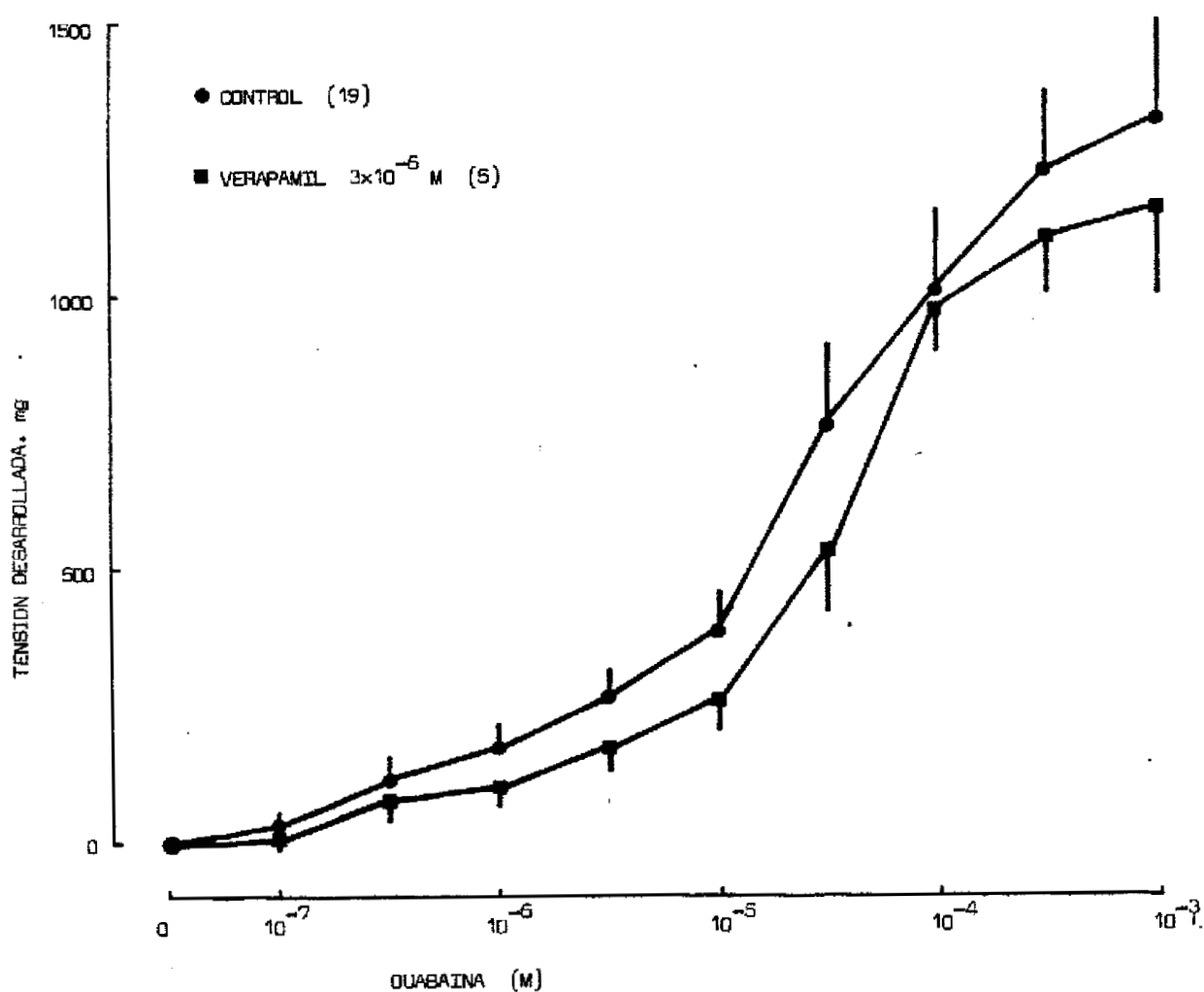


Fig. 14: Respuesta de las arterias femorales de gato a con-  
centraciones crecientes de ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en pre-  
sencia de  $3 \times 10^{-6}$  M de verapamil administrado 10 min. an-  
tes de iniciarse la curva dosis-respuesta. La metodología  
y los símbolos usados son semejantes a los de figuras ante-  
riores. El número de experimentos realizados se muestra en  
tre paréntesis.

ra obtener una respuesta vasoconstrictora con cualquier dosis de ouabaina utilizada (Fig. 13). Sin embargo, la administración del antagonista de los canales de calcio verapamil,  $3 \times 10^{-6}$  M, 10 min antes de la administración de ouabaina, no produjo alteraciones significativas en la curva dosis-respuesta al cardiotónico (Fig. 14).

Efecto del vanadato en arterias cerebrales de gato

En primer lugar se estudió la capacidad de diversos compuestos de vanadio, con distintos estados de oxidación, para producir respuestas contráctiles en arterias cerebrales aisladas de gato. Se escogieron el vanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ;  $\text{V} + 5$ ), el sulfato de vanadio ( $\text{SO}_4\text{VO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{V} + 4$ ), cloruro de vanadio ( $\text{Cl}_3\text{V}$ ;  $\text{V} + 3$ ) y óxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ;  $\text{V} + 5$ ). Las curvas dosis-respuesta a cada uno de ellos (de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}\text{M}$ ) se representan en las Figs. 15 y 16. Todos produjeron un aumento del tono de las arterias cerebrales, que fué dependiente de la dosis empleada. En concentraciones bajas dicho incremento fué discreto, alcanzando sólo valores considerables a partir de  $10^{-4}\text{M}$ . Cantidades superiores de estos agentes lograron todavía incrementos de tensión, pero tales concentraciones precipitaban parcialmente en el baño. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos compuestos de vanadio. En experimentos posteriores se utilizó el vanadato sódico como representante de este tipo de agentes.

El bloqueo de los receptores alfa-adrenérgicos con  $3 \times 10^{-6}\text{M}$  de fentolamina no disminuyó la vasoconstricción inducida por vanadato, e incluso se registró un leve aumento en la respuesta de los vasos (Fig. 17). El pretratamiento de los animales con reserpina tampoco supuso modificación sustancial en la curva dosis-respuesta a este agente (Fig. 18).

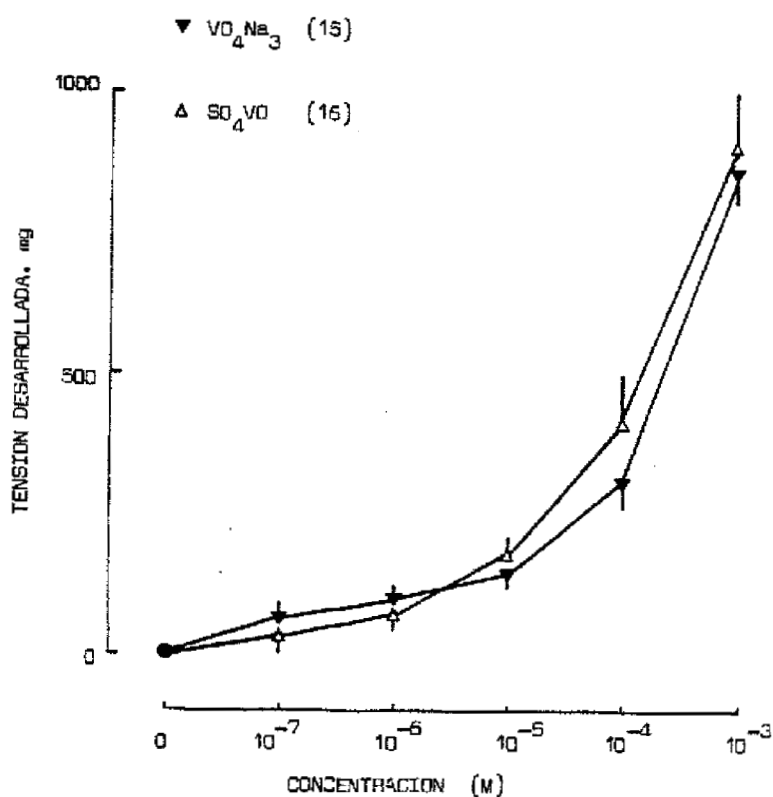


Fig. 15: Curva dosis-respuesta a vanadato sódico ( $\text{VO}_4\text{Na}_3$ ;  $V \pm 5$ ) y sulfato de vanadio ( $\text{SO}_4\text{VO}$ ;  $V \pm 4$ ) en arterias cerebrales de gato. Las concentraciones empleadas fueron de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M, y están reflejadas en abscisas. Los incrementos de tensión producidos se registran en ordenadas. Entre las sucesivas adiciones de cada agente transcurrieron 5 min. Los números entre paréntesis representan los experimentos realizados en cada caso. Los puntos corresponden a la media aritmética de la contracción alcanzada y las líneas verticales el error standard de la media.

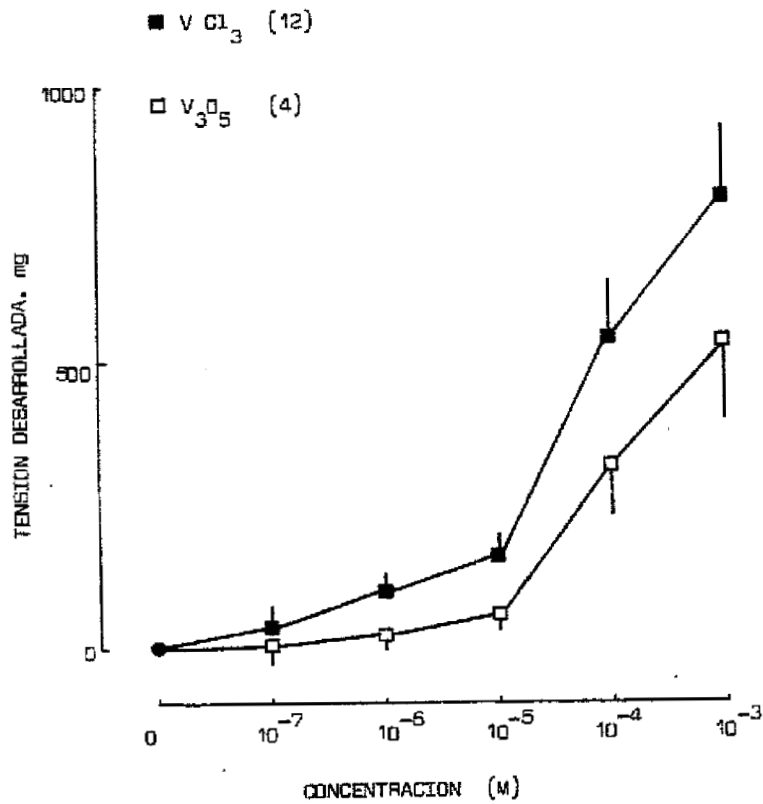


Fig. 16: Curva dosis-respuesta a cloruro de vanadio ( $Cl_3V$ ;  $V \uparrow 3$ ) y óxido de vanadio ( $V_2O_5$ ;  $V \uparrow 5$ ) en arterias cerebrales de gato (de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M). La metodología, los símbolos y la representación empleadas son semejantes en todo a los de la figura anterior.



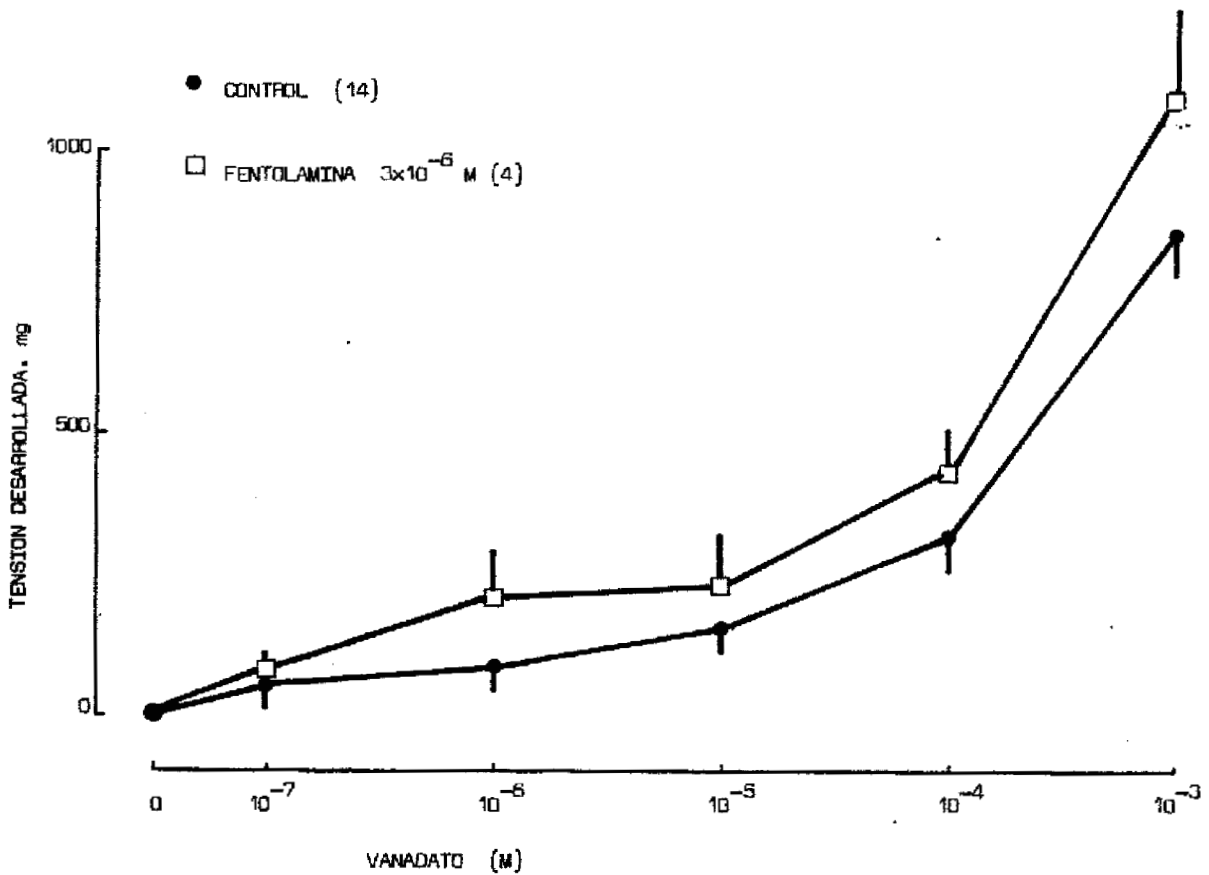


Fig. 17: Influencia de fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M) en la respuesta de las arterias cerebrales aisladas de gato a concentraciones crecientes ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) de vanadato sódico. La fentolamina se añadió al baño 10 min antes del comienzo de la curva. Entre cada nueva dosis de vanadato, en abscisas, se dejó pasar un tiempo de 5 min. La tensión desarrollada - se representa en ordenadas. El número de experimentos hechos para confeccionar la gráfica figura entre paréntesis. Los puntos reflejan la media y las líneas verticales el error - estandard.

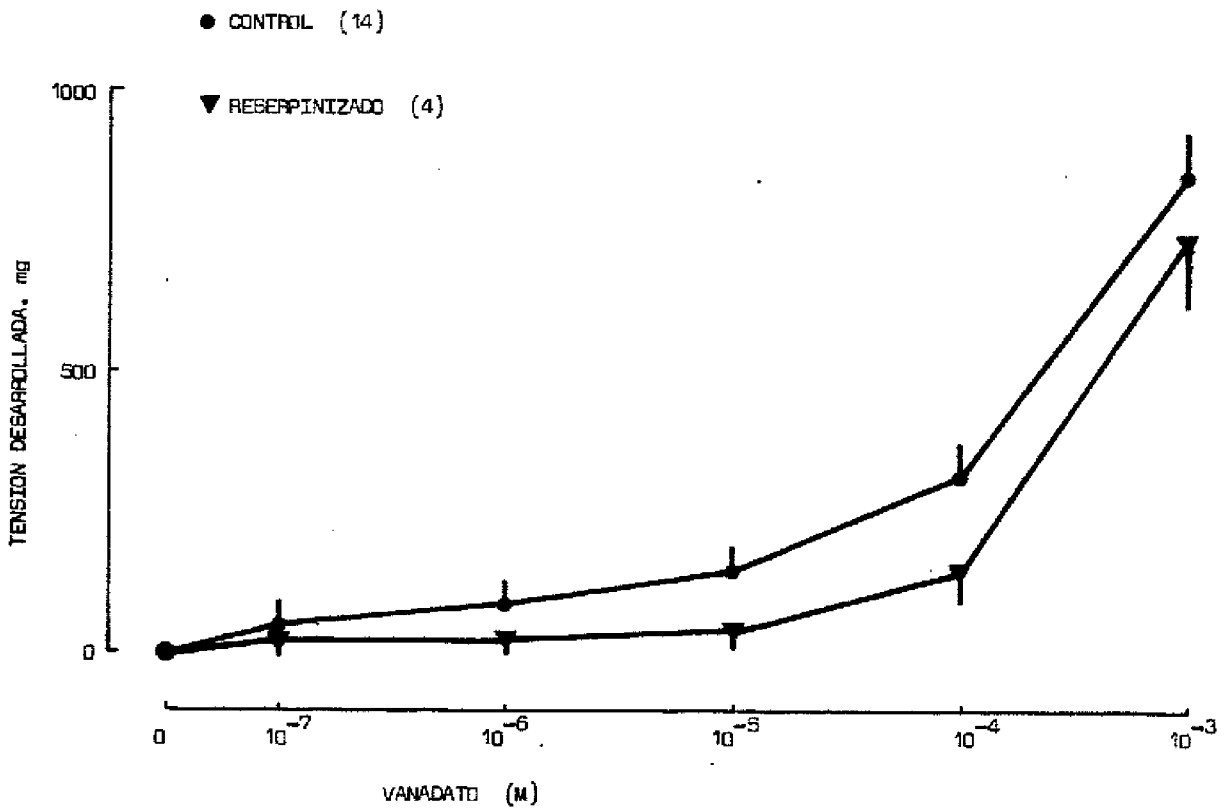


Fig. 18: Efecto de la reserpinización en la curva dosis-respuesta a vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias cerebrales de gato. La metodología y los símbolos utilizados se describen en figura anterior.

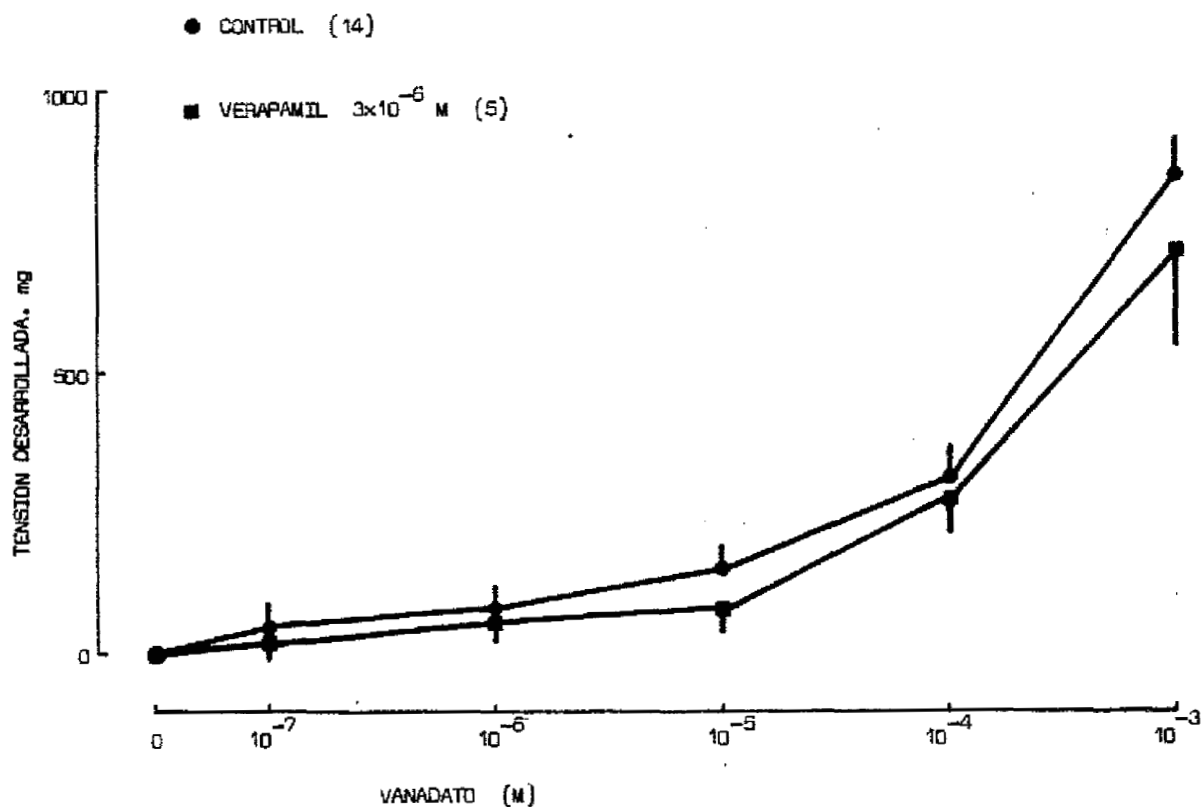


Fig. 19: Respuesta vasoconstrictora inducida por vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias cerebrales de gato en presencia de verapamil ( $2 \times 10^{-6}$  M). Este fármaco se añadió 10 min antes de la primera dosis de vanadato. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados. Los métodos seguidos en la confección de la gráfica y los símbolos usados son similares a los de figuras anteriores.

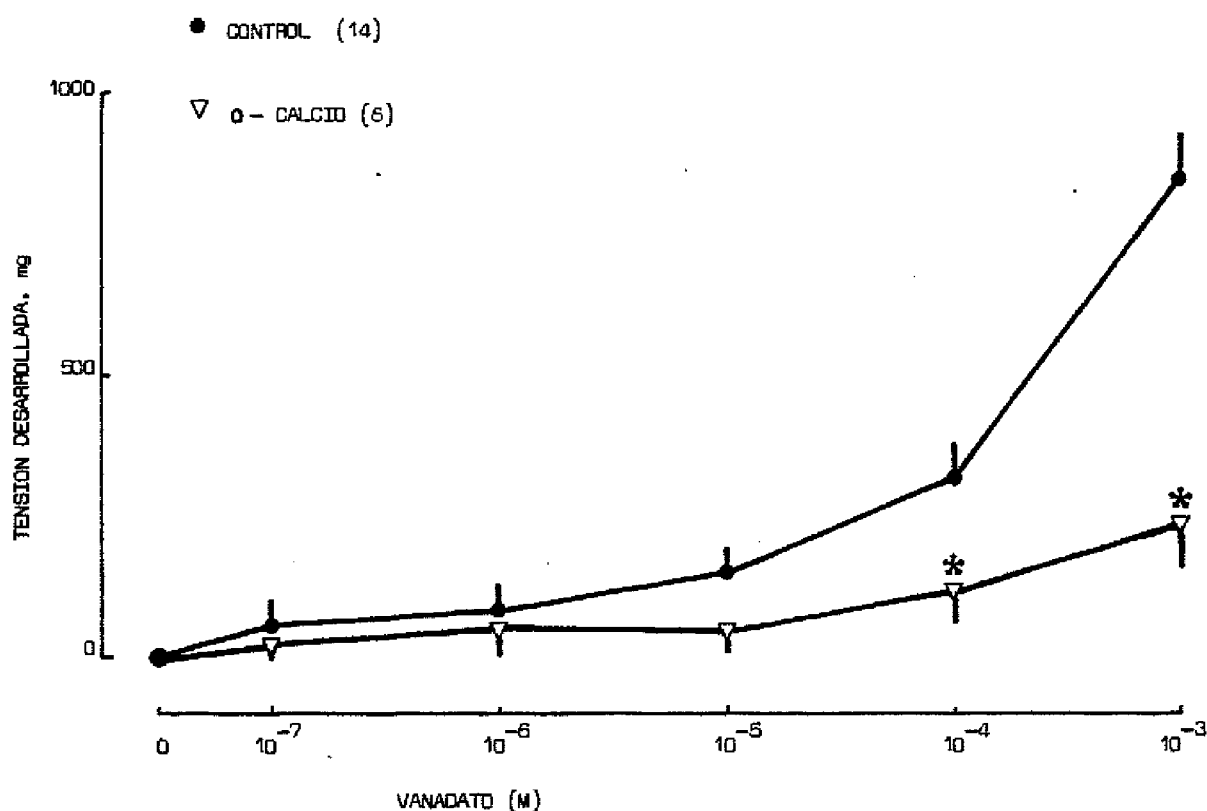


Fig. 20: Influencia de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la curva de respuesta a vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias cerebrales de gato. La retirada del calcio en el medio se efectuó 30 min antes de comenzar la curva. La vasoconstricción alcanzada se refleja en ordenadas y las concentraciones de vanadato, añadido en intervalos de 5 min, en abscisas. Los puntos representan la media aritmética y las barras verticales el error estándar. Los números entre paréntesis corresponden a los experimentos llevados a cabo. Los asteriscos indican la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

De igual modo, el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes con verapamil ( $3 \times 10^{-6}\text{M}$ ) no produjo al teración apreciable en la contracción desarrollada por el va nadato en las arterias cerebrales (Fig. 19). Sin embargo, la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular originó una significativa reduc ción del aumento de tensión inducido por las concentraciones más elevadas del fármaco (Fig. 20), aunque persistió un peque ño componente vasoconstrictor no dependiente, por tanto, del calcio presente en el medio (Fig. 20). La readición de  $\text{Ca}^{2+}$  produjo una recuperación total de la contracción inicial (re sultados no mostrados).

Acciones vasoconstrictoras de vanadato en arterias femorales de gato

En segmentos de arterias femorales se realizaron - también curvas dosis-respuestas a vanadato sódico, sulfato, cloruro y óxido de vanadio en concentraciones que oscilaron entre  $10^{-7}$  y  $10^{-3}$  M (Figs. 21 y 22). Estos agentes indujeron incrementos de tensión que fueron dependientes de la dosis - empleada. En este tipo de vasos el óxido de vanadio originó una respuesta sensiblemente inferior a la de los otros com-- puestos (Fig. 22). En cualquier caso, el aumento de tono obtenido por todos los preparados de vanadio en las arterias fe-- morales fué de pequeña magnitud en comparación con el logra-- do en los vasos cerebrales.

La adición de fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M) al baño, 10 min antes de iniciarse la curva, o el tratamiento previo de -- los animales con reserpina no produjeron cambios estadística-- mente significativos en el desarrollo de la misma (Figs. 23 y 24).

Por otro lado, el verapamil ( $3 \times 10^{-6}$  M) no indujo modificaciones importantes en la respuesta de las arterias fe-- morales al vanadato (Fig. 25). Sin embargo, la contracción in-- ducida por este agente fué dependiente del calcio extracelular ya que la omisión de este ión del medio anuló prácticamente la respuesta vasoconstrictora (Fig. 26).

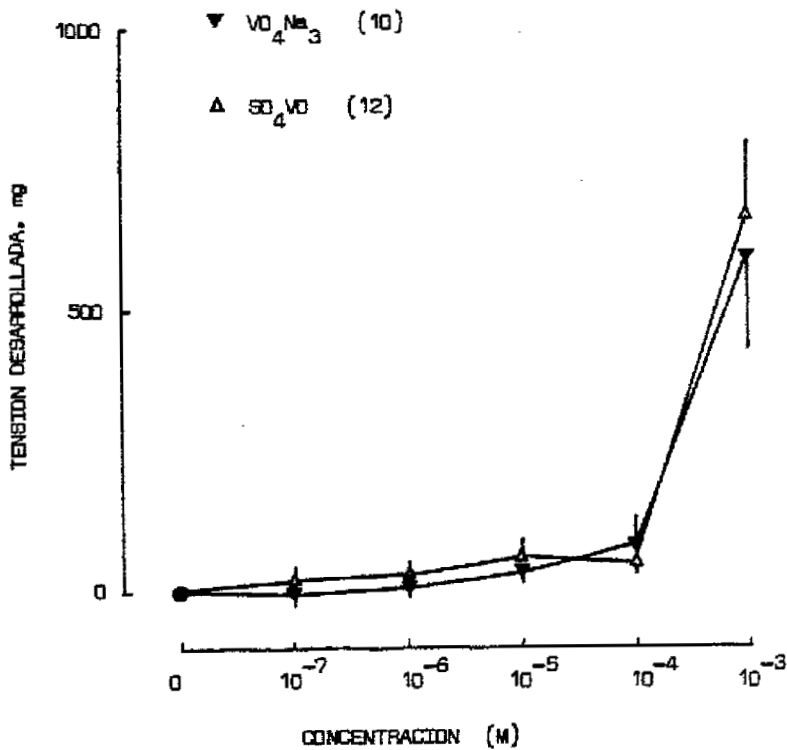


Fig. 21: Curva dosis-respuesta a vanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; V + 5) y sulfato de vanadio ( $\text{SO}_4\text{VO}$ ; V + 4) (ambos de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias femorales de gato. La contracción obtenida se muestra en ordenadas y en abscisas se observa la concentración administrada en cada punto, y a intervalos de 5 min. Los experimentos realizados se señalan entre paréntesis. Los puntos representan la media de la contracción y los trazos verticales el error standard.

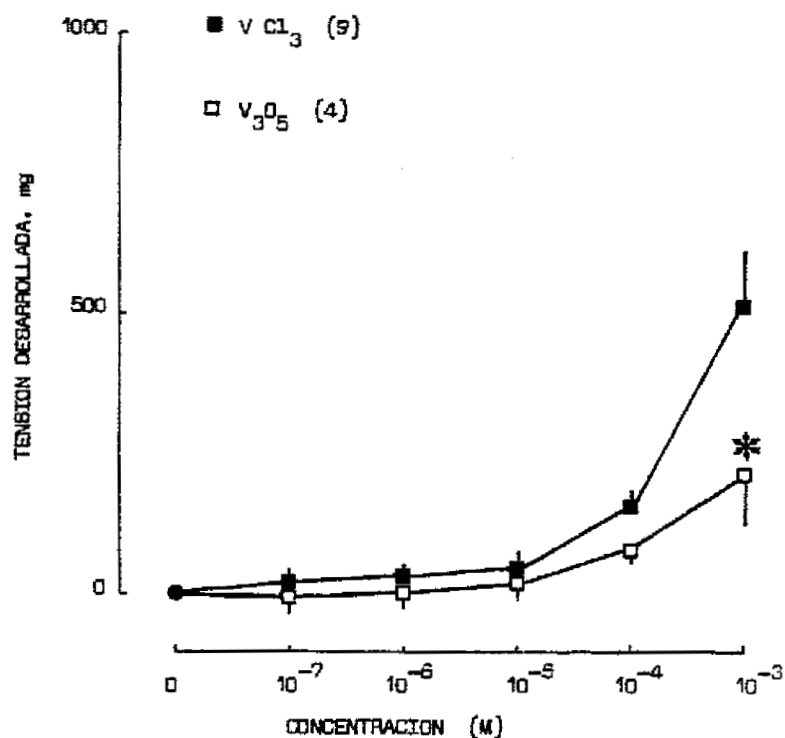


Fig. 22: Curva dosis-respuesta a cloruro de vanadio ( $Cl_3V$ ;  $V \uparrow 3$ ) y óxido de vanadio ( $V_2O_5$ ;  $V \uparrow 5$ ), igualmente en concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M. La metodología y los símbolos utilizados son idénticos a los de la figura anterior. El asterisco indica la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).



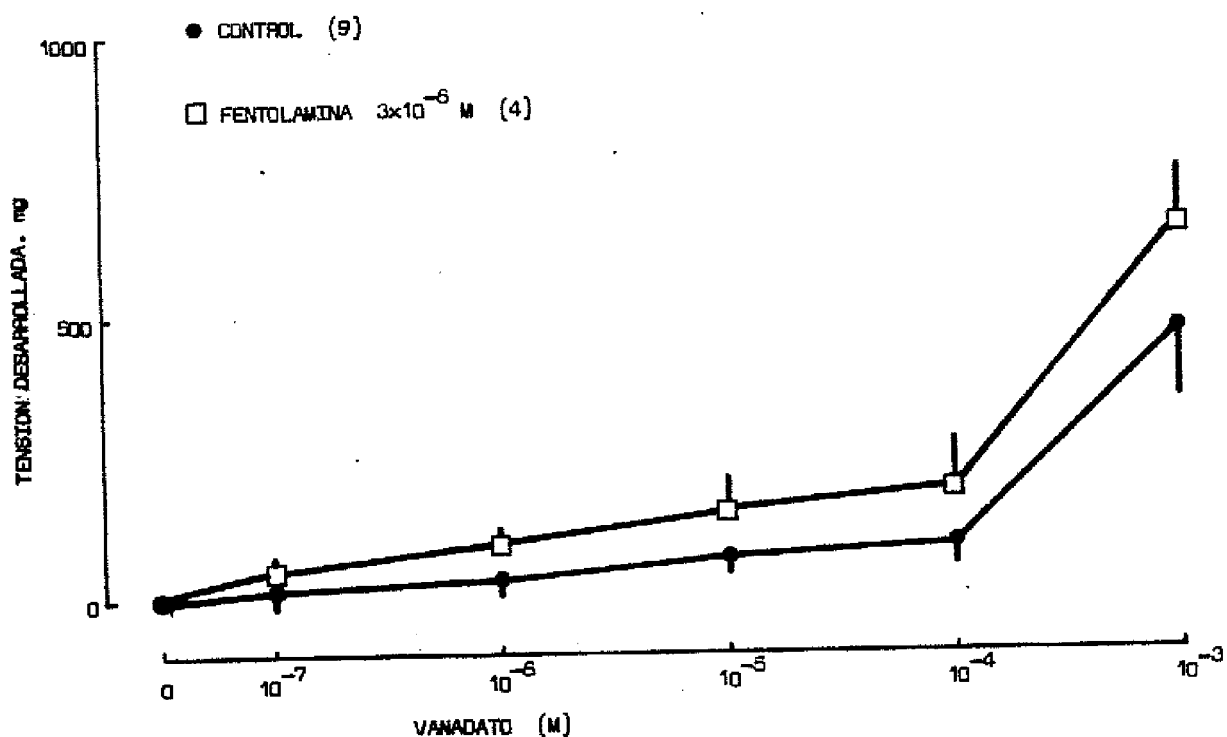


Fig. 23: Acción de la fentolamina ( $3 \times 10^{-6}$  M) en la respuesta de las arterias femorales de gato a vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M). El bloqueante alfa-adrenérgico se añadió al medio 10 min antes del comienzo de la curva. La tensión alcanzada en mg se observa en ordenadas. La concentración de vanadato, administrada a intervalos de 5 min, puede apreciarse en abscisas. Los puntos corresponden a la media aritmética de la contracción desarrollada y el error estándar se representa por las líneas verticales. Los experimentos que se hicieron en cada caso se indican entre paréntesis.

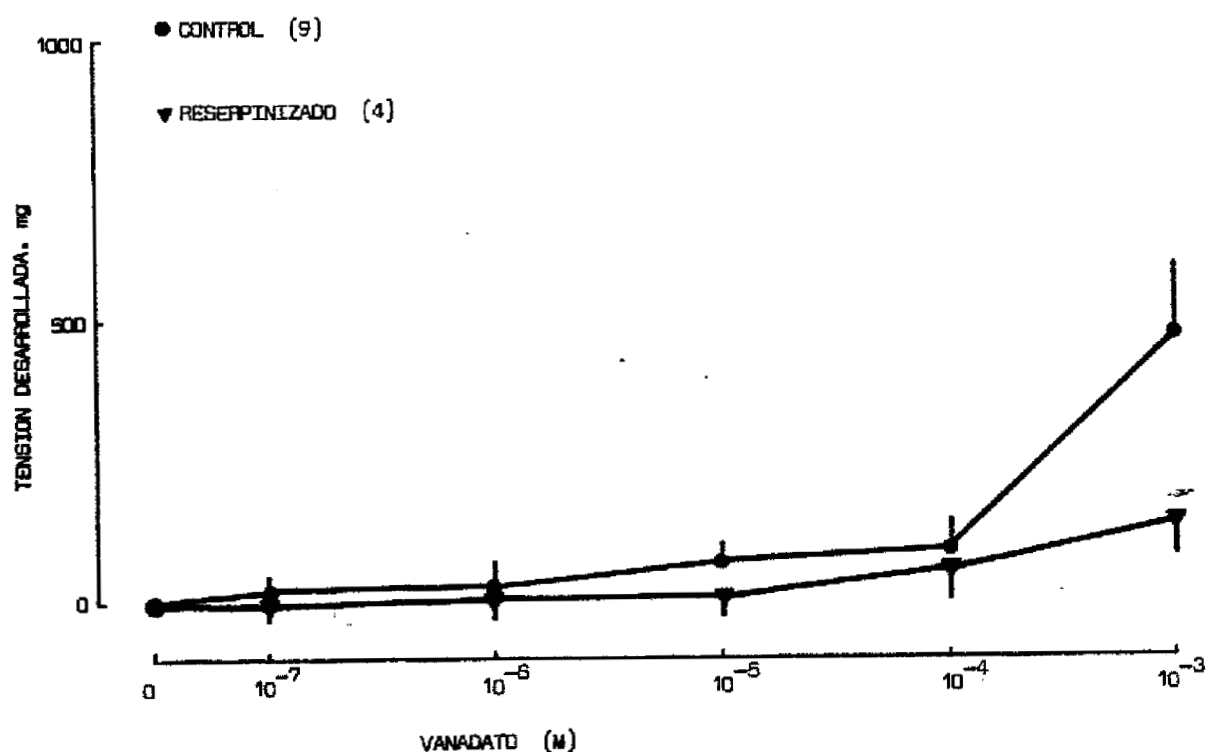


Fig. 24: Influencia de la reserpinización de los animales en la respuesta de las arterias femorales de gato a dosis crecientes de vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M). El número de casos realizados consta entre paréntesis. La metodología y los signos empleados se describen en figuras anteriores.

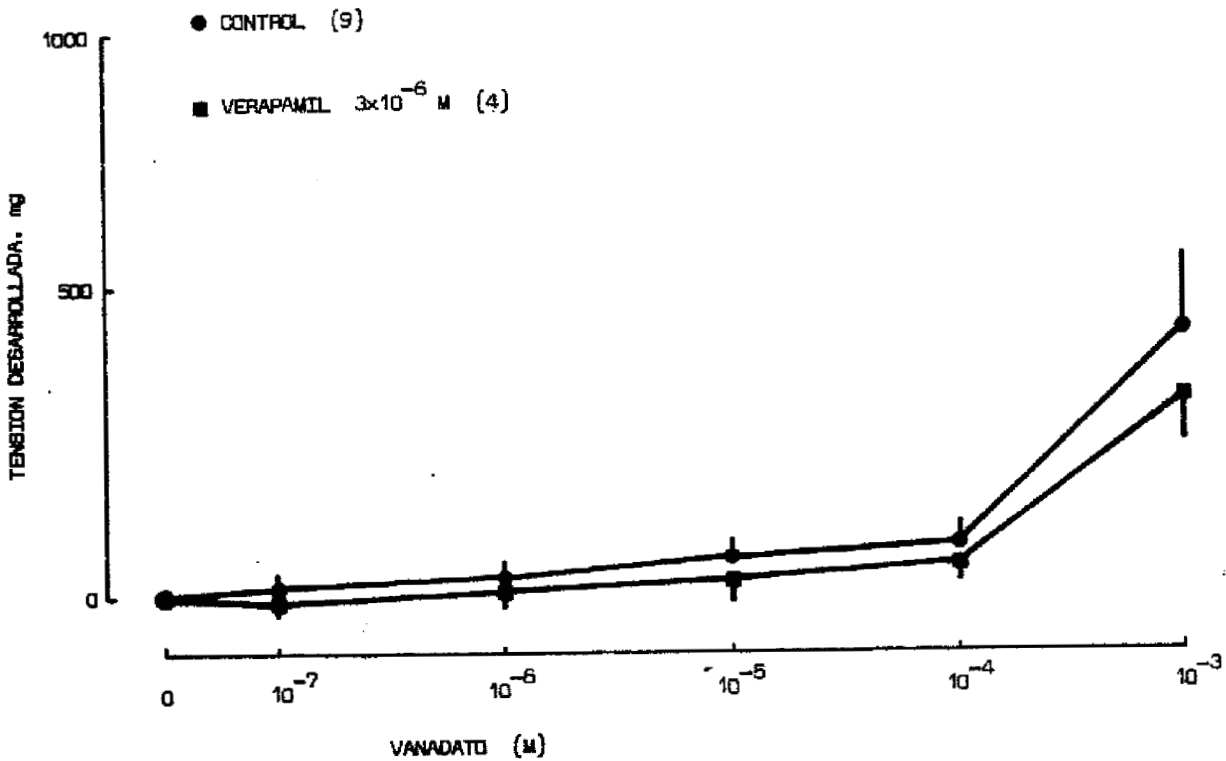


Fig. 25: Efecto de  $2 \times 10^{-6}$  M de verapamil en la curva dosis-respuesta a vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) en arterias femorales de gato. La contracción obtenida figura en ordenadas y la concentración de vanadato en abscisas, administradas en intervalos de 5 min. Las cifras entre paréntesis representan los experimentos realizados. Cada punto corresponde a la media aritmética de la tensión desarrollada y el error estándar está reflejado en las barras verticales.

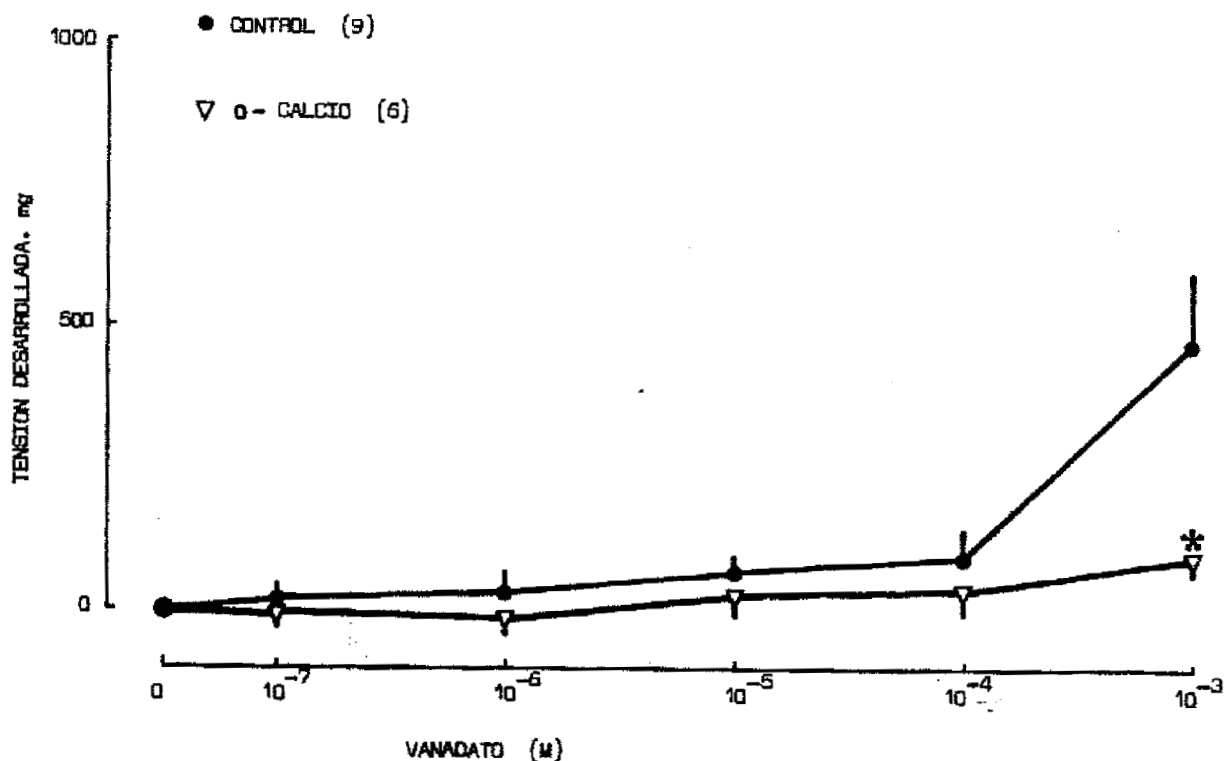


Fig. 26: Influencia de la supresión del calcio del medio extracelular en la respuesta de las arterias femorales de gato a concentraciones crecientes de vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ M). La supresión de  $Ca^{2+}$  se hizo 30 min antes de añadir la primera dosis del fármaco. Los símbolos y los métodos utilizados son análogos a los de figuras anteriores. El asterisco indica la existencia de significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

Efecto de la administración conjunta de ouabaina y vanadato en arterias cerebrales y femorales de gato

Una vez establecida la capacidad vasoconstrictora de ouabaina y vanadato sobre las arterias cerebrales y femorales, se investigó la influencia que cada uno de estos fármacos tenía en la respuesta del otro. Para ello se administró primero una dosis única de  $10^{-4}$  M de ouabaina, en ambos tipos de arterias, y transcurridos 5 min se añadió el vanadato ( $10^{-3}$  M). Dicho agente incrementó significativamente la contracción producida por el digitálico, tanto en las arterias cerebrales como en las femorales (Fig. 27). También se experimentó el proceso inverso, añadiendo primero el vanadato -- ( $10^{-3}$  M) para, a los 5 min, administrar la ouabaina ( $10^{-4}$  M), con un resultado muy parecido (Fig. 28).

Ulteriormente se realizó una adición conjunta de dosis crecientes y acumulativas de ambos fármacos, ouabaina ( $5 \times 10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) y vanadato ( $10^{-7}$  a  $2 \times 10^{-3}$  M), en los dos tipos de segmentos vasculares. Tanto en los vasos cerebrales como en las arterias femorales (Figs. 29 y 30) se observó una aparente sumación de los efectos contráctiles producidos por cada agente, utilizado por separado (Ver Figs. 4, 10, 15 y 21).

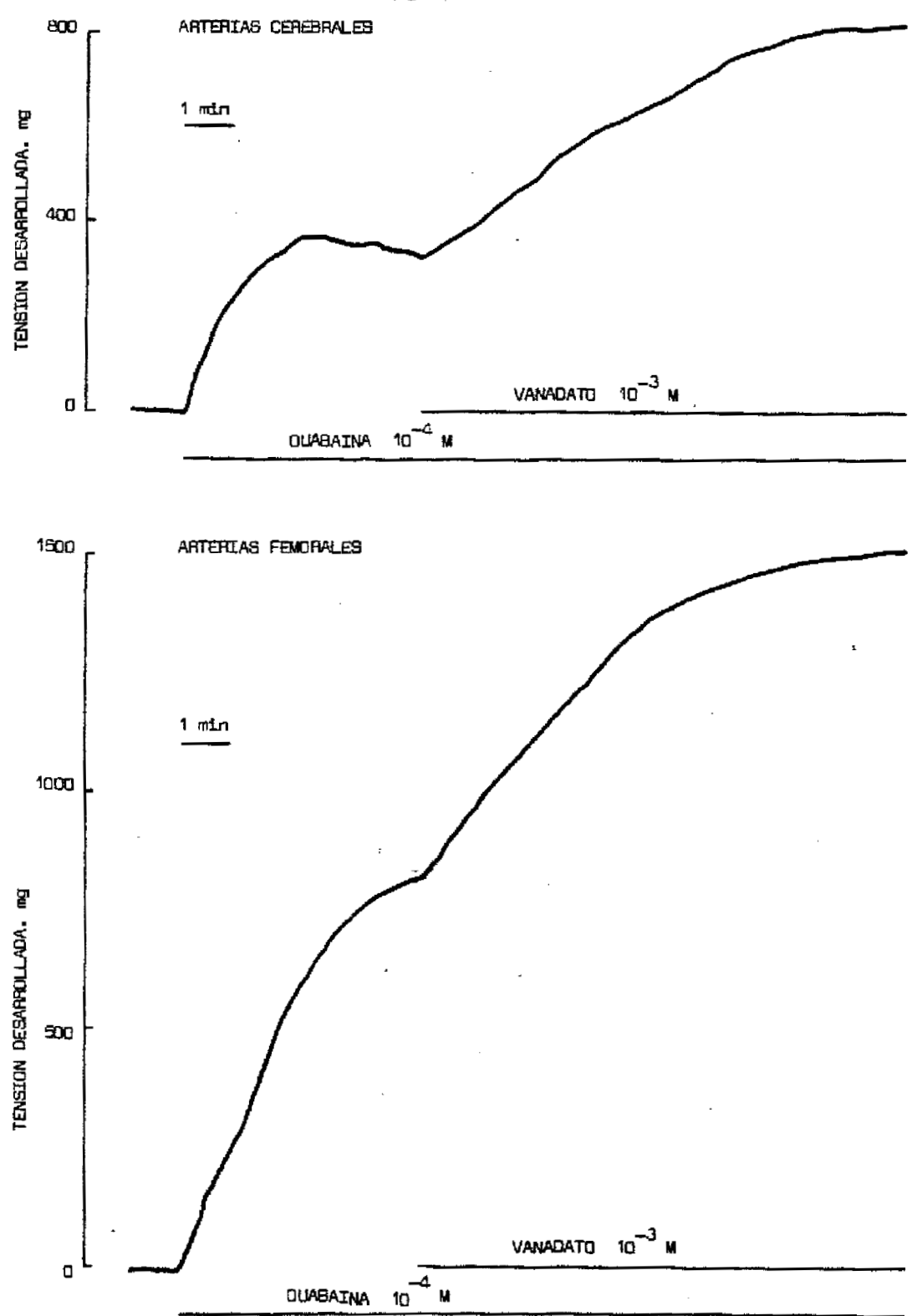


Fig. 27: Caso modelo representativo de la interacción existente entre los efectos contráctiles desencadenados por ouabaina ( $10^{-4}$  M) y vanadato ( $10^{-3}$  M) en arterias cerebrales y femorales de gato. La tensión desarrollada en mg se muestra en ordenadas y el tiempo transcurrido en abscisas. En ambos casos se administró primeramente una dosis única de  $10^{-4}$  M de ouabaina y, tras 5 min de intervalo, se procedió a la adición de vanadato ( $10^{-3}$  M) sobre la contracción previa producida por el digitálico. La duración completa de experimento fué de 15 min. Las barras horizontales representan el período de exposición a cada fármaco.

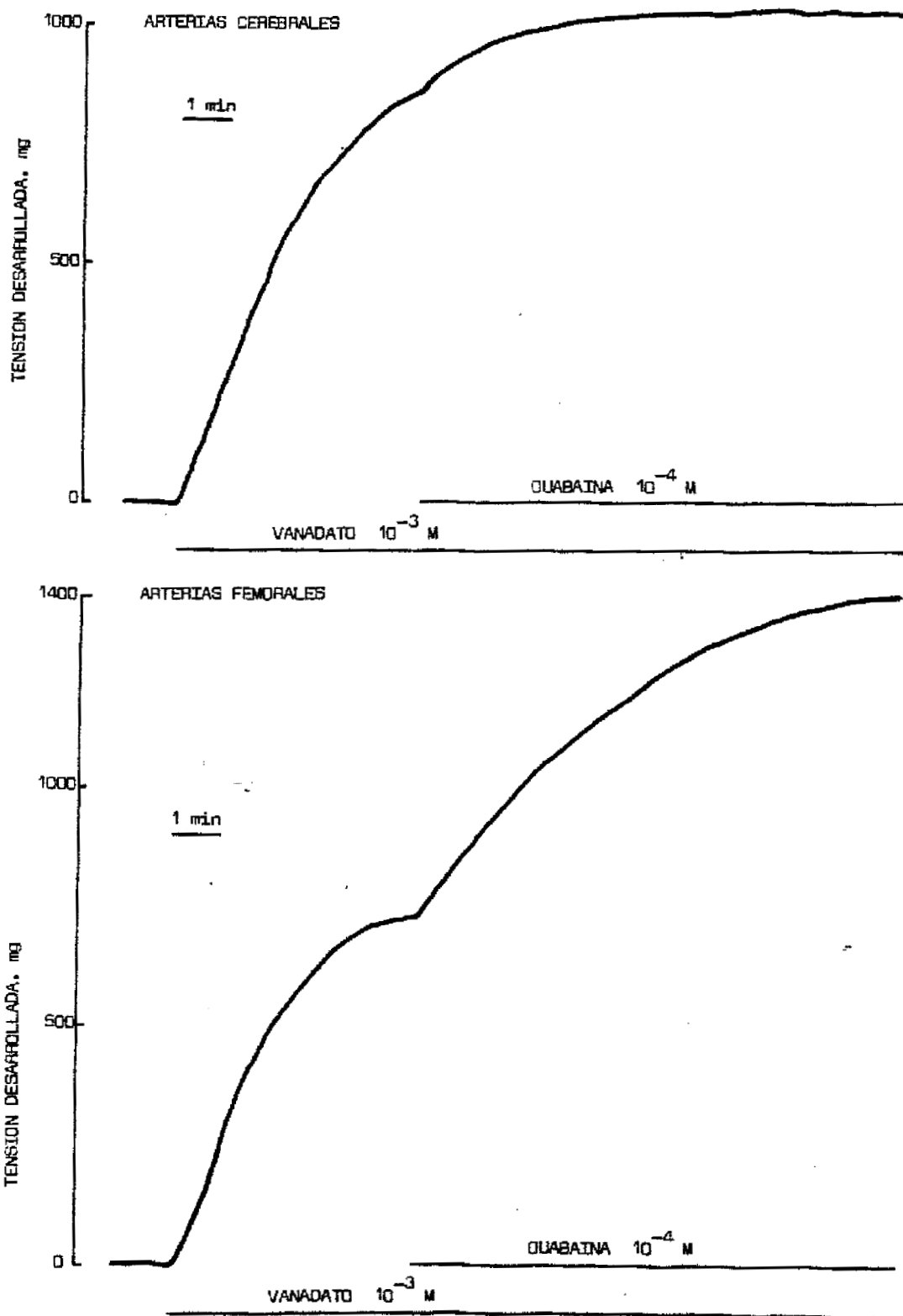


Fig. 28: Caso modelo representativo de la interacción existente entre vanadato ( $10^{-3}$  M) y ouabaina ( $10^{-4}$  M) en arterias cerebrales y femorales de gato. La metodología y los símbolos empleados son similares a los de la figura anterior.

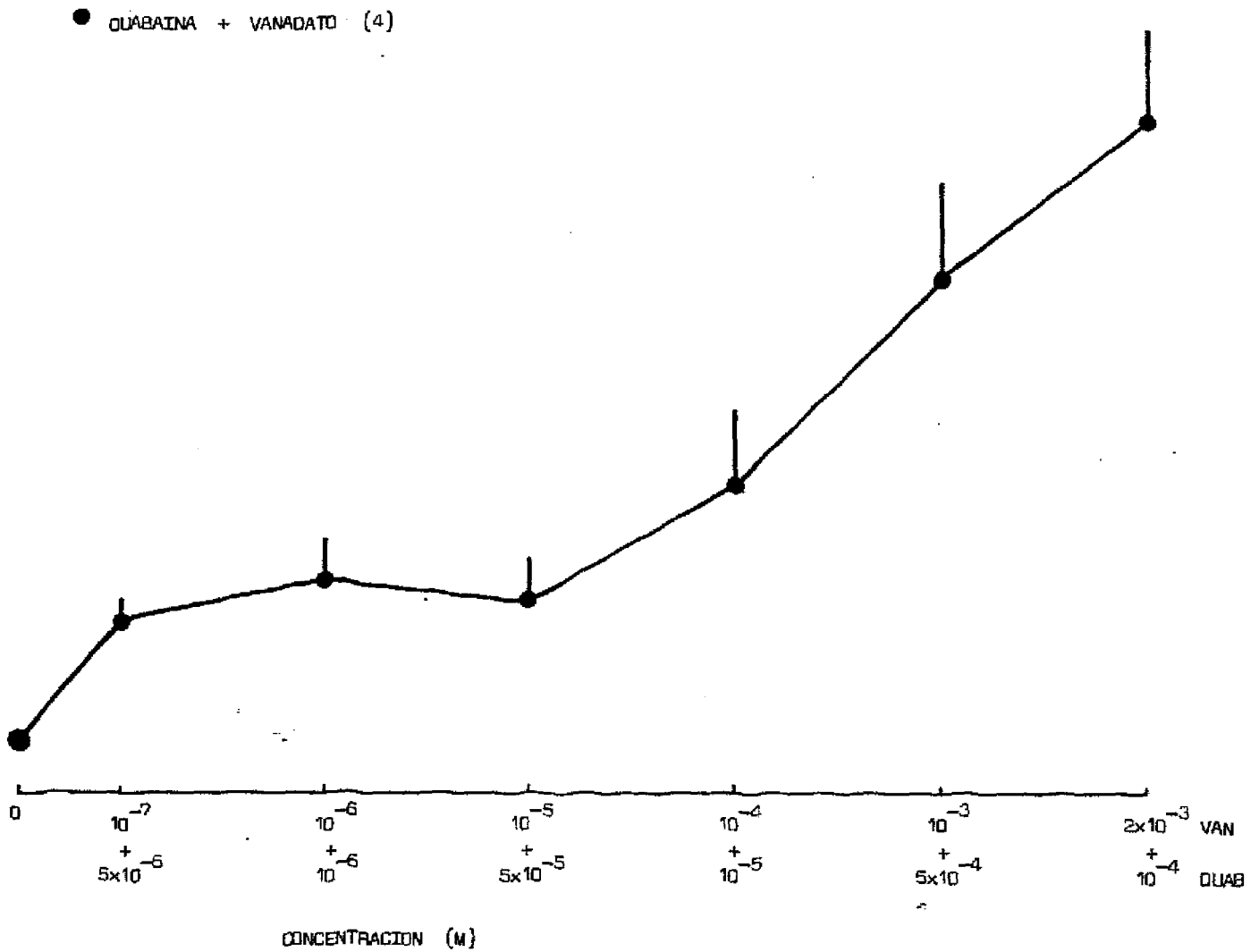


Fig. 29: Respuesta de las arterias cerebrales de gato a la administración simultánea de dosis crecientes y acumulativas de ouabaina ( $5 \times 10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) y vanadato ( $10^{-7}$  a  $2 \times 10^{-3}$  M). La contracción alcanzada se muestra en ordenadas; la concentración de los fármacos añadidos en cada momento, con intervalos de 5 min, están reflejadas en abscisas. El número entre paréntesis corresponde a los experimentos realizados. Cada punto representa la media aritmética de la tensión desarrollada y las líneas verticales el error estándar.



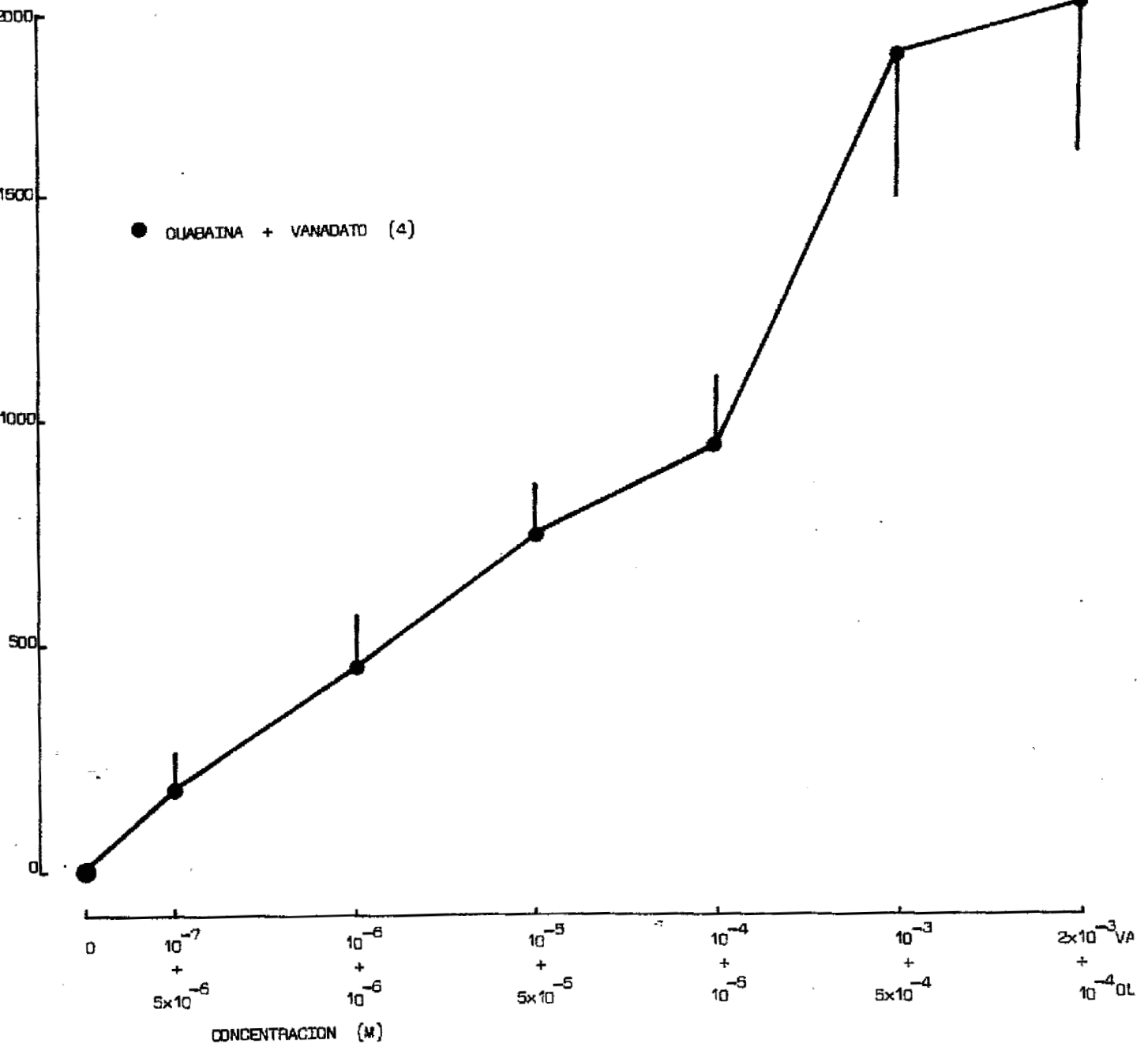


Fig. 30: Efecto de la administración simultánea de dosis crecientes y acumulativas de ouabaina ( $5 \times 10^{-6}$  a  $10^{-4}$ M) y vanadato ( $10^{-7}$  a  $2 \times 10^{-3}$  M) en arterias femorales de gato. La metodología y los símbolos son idénticos a los de la Fig. 29.

Efecto de la reducción del sodio extracelular (11.9 mM) en arterias cerebrales y femorales de gato

A continuación se trató de establecer la influencia de la disminución de Na<sup>+</sup> extracelular en la tensión basal de ambos tipos de arterias, y el efecto de ouabaina y vanadato en tales condiciones.

En las arterias cerebrales, la sustitución de la solución habitual por otra con un contenido de 11.9 mM de Na<sup>+</sup> originó una rápida vasoconstricción, que alcanzó su máxima intensidad en el primer minuto; posteriormente se observó una marcada relajación de los segmentos vasculares, que llegaron a recuperar la tensión basal a los 10 min del cambio de la solución (Fig. 31). A los 30 min se procedió a la administración de dosis crecientes y acumulativas de ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) o vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M). La reducción de la concentración de sodio produjo una práctica abolición de la respuesta contráctil de las arterias cerebrales de gato a todas las concentraciones de ouabaina utilizadas (Fig. 32). Sin embargo, con vanadato en estas mismas condiciones, <sup>se</sup> produjo una disminución de la respuesta vasoconstrictora que fué significativa respecto a la obtenida en Krebs normal en los tres últimos puntos de la curva (Fig. 23).

Por otro lado, las arterias femorales, en estas mismas condiciones, se comportaron de forma diferente. Así, el cambio de medio produjo también un acusado incremento de ten-

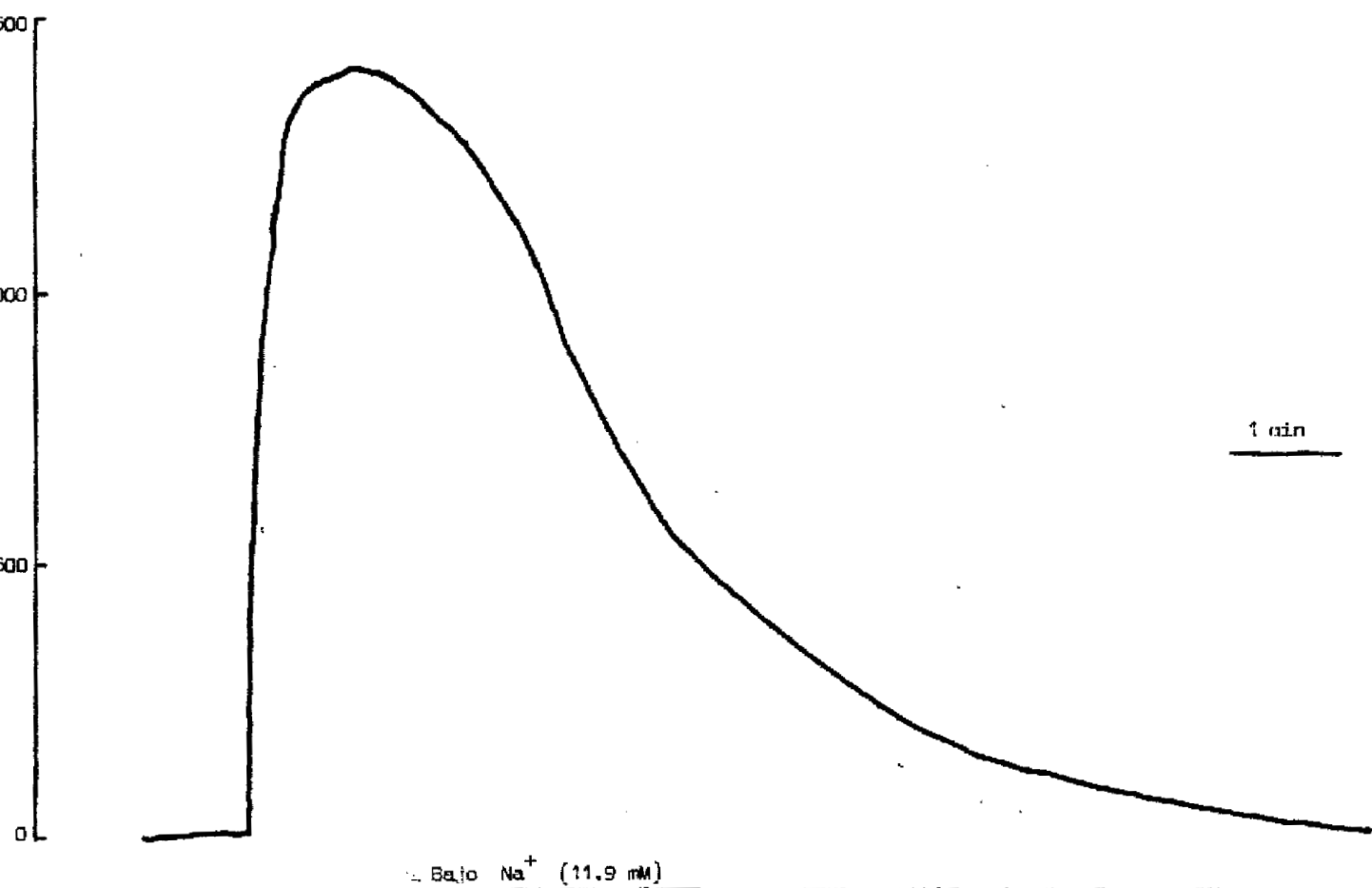


Fig. 31: Efecto de la reducción del Na<sup>+</sup> extracelular a 11,9 mM sobre el tono basal de arterias cerebrales de gato. La tensión obtenida se muestra en ordenadas, y el tiempo transcurrido se representa en abscisas. La barra horizontal inferior señala el período de incubación con bajo Na<sup>+</sup>.

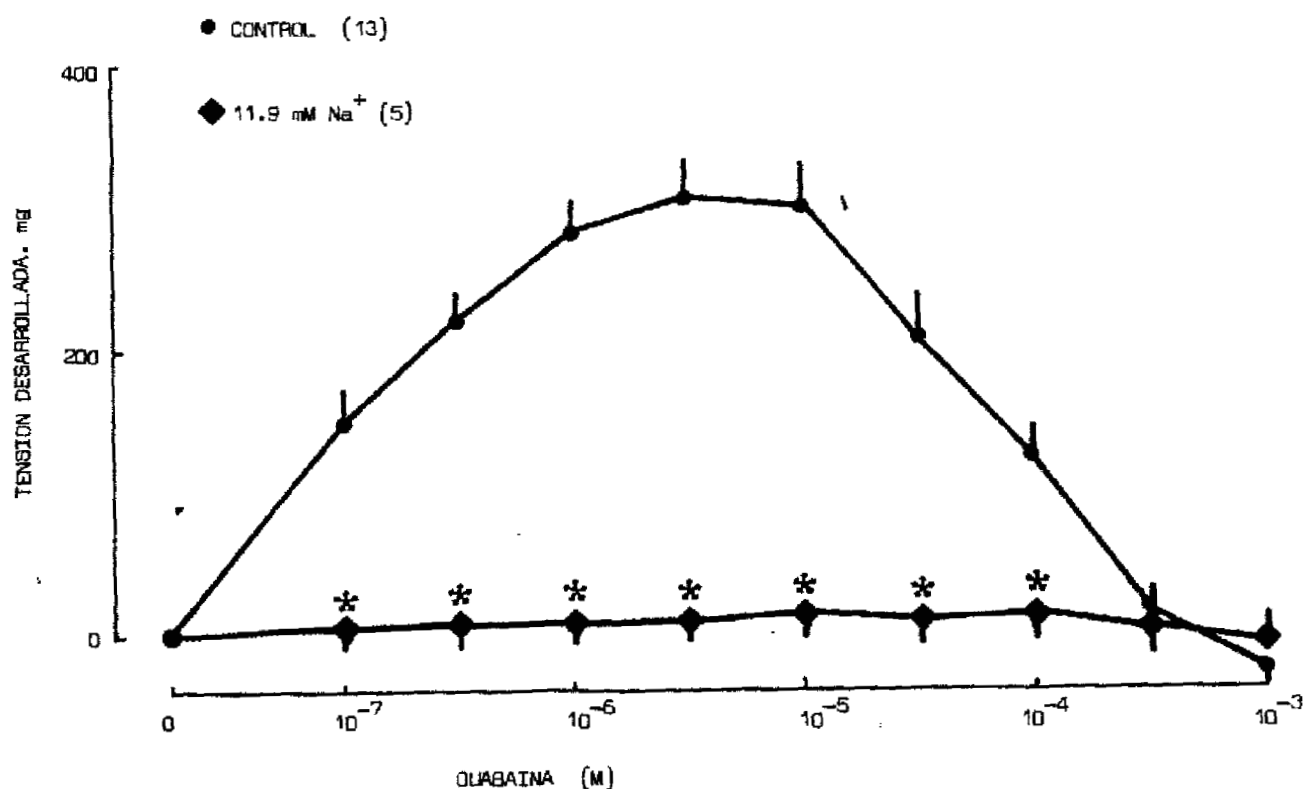


Fig. 32: Influencia de la disminución de Na<sup>+</sup> extracelular -- (11,9 mM) sobre la respuesta de las arterias cerebrales a ouabaina (10<sup>-7</sup> a 10<sup>-3</sup> M). El fármaco comenzó a administrarse 30 min después de la exposición de los vasos al medio bajo en sodio. La contracción alcanzada se muestra en ordenadas y la concentración del cardiotónico, añadido a intervalos de 5 min, en abscisas. Los puntos representan la media y las barras verticales el error estándar de la misma. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados. Los asteriscos señalan la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

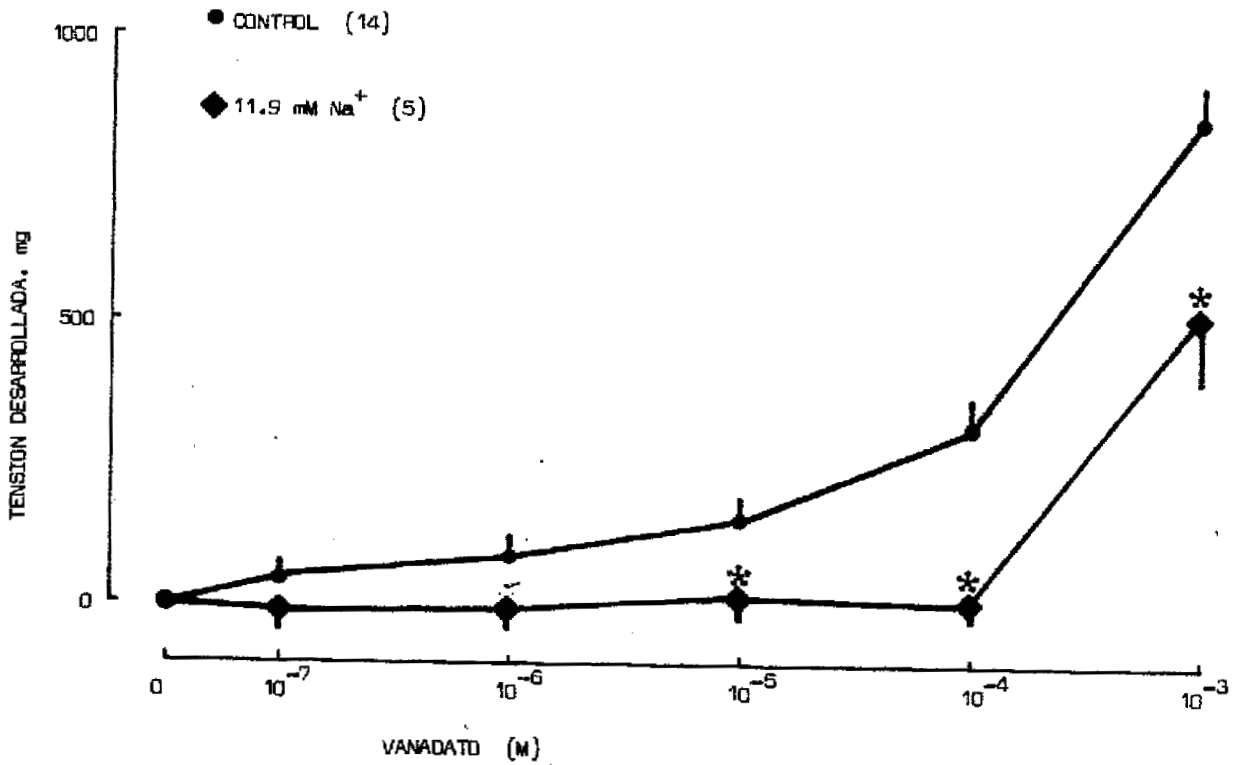


Fig. 33: Efecto de la reducci3n de Na<sup>+</sup> extracelular en la respuesta provocada por vanadato (10<sup>-7</sup> a 10<sup>-3</sup> M) en las arterias cerebrales de gato. La metodologfa y los sfbolos utilizados son idbnticos a los descritos en la figura anterior. Los asteriscos representan la significaci3n estadfstica ( $p \leq 0,05$ ).

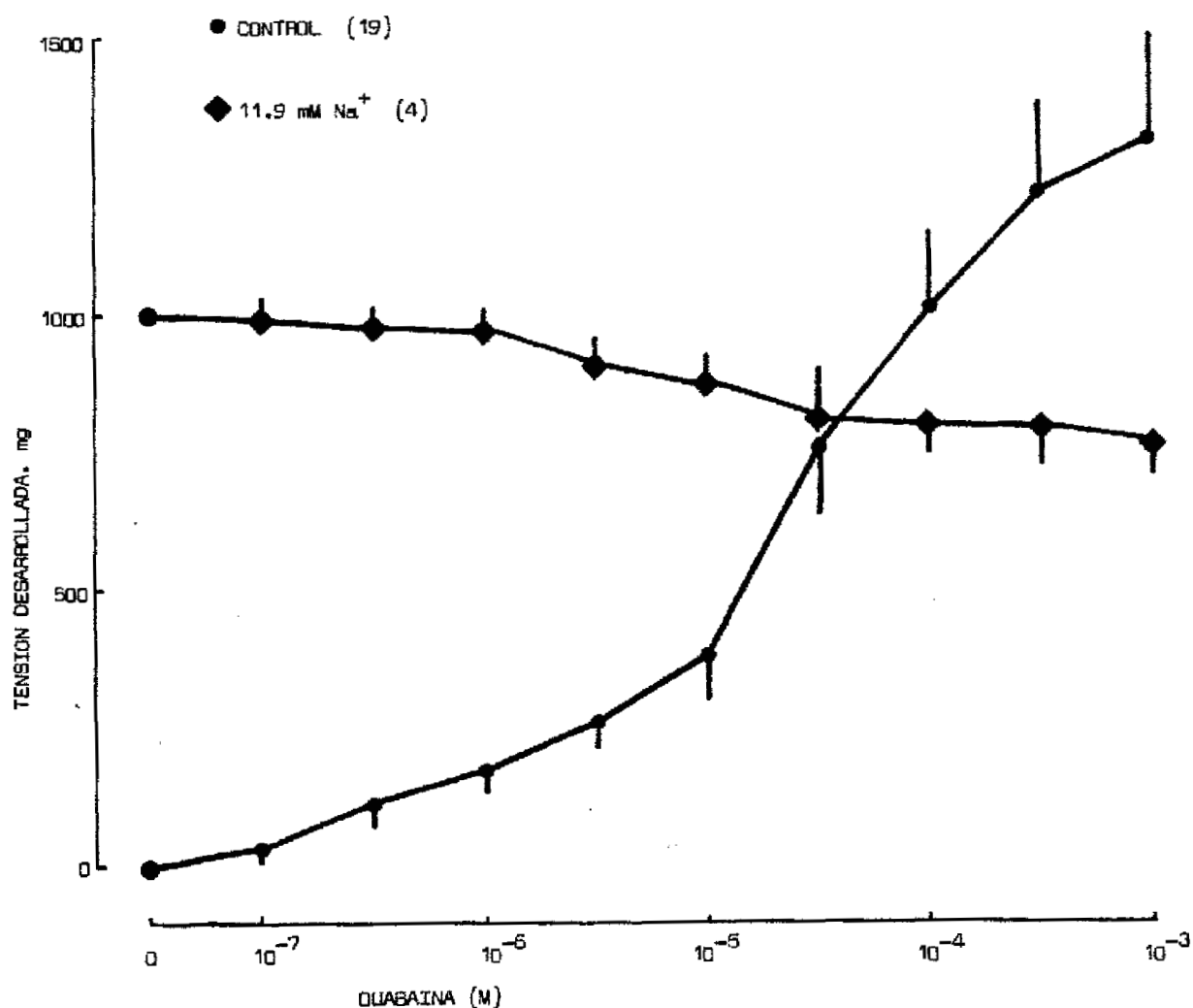


Fig. 35: Efecto de dosis crecientes de ouabaina ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ M) en arterias femorales de gato previamente incubadas durante 30 min en un medio con 11.9 mM de Na<sup>+</sup>. En ordenadas puede ver se la tensión desarrollada en mg y en abscisas la concentración del fármaco, administrado a intervalos de 5 min. Los puntos corresponden a la media de la contracción obtenida y las líneas verticales al error estándar de la media. Los experimentos realizados se indican entre paréntesis. No se estableció la significación estadística entre la curva control y la experimental por considerarse que los grupos de experimentos no eran homogéneos.

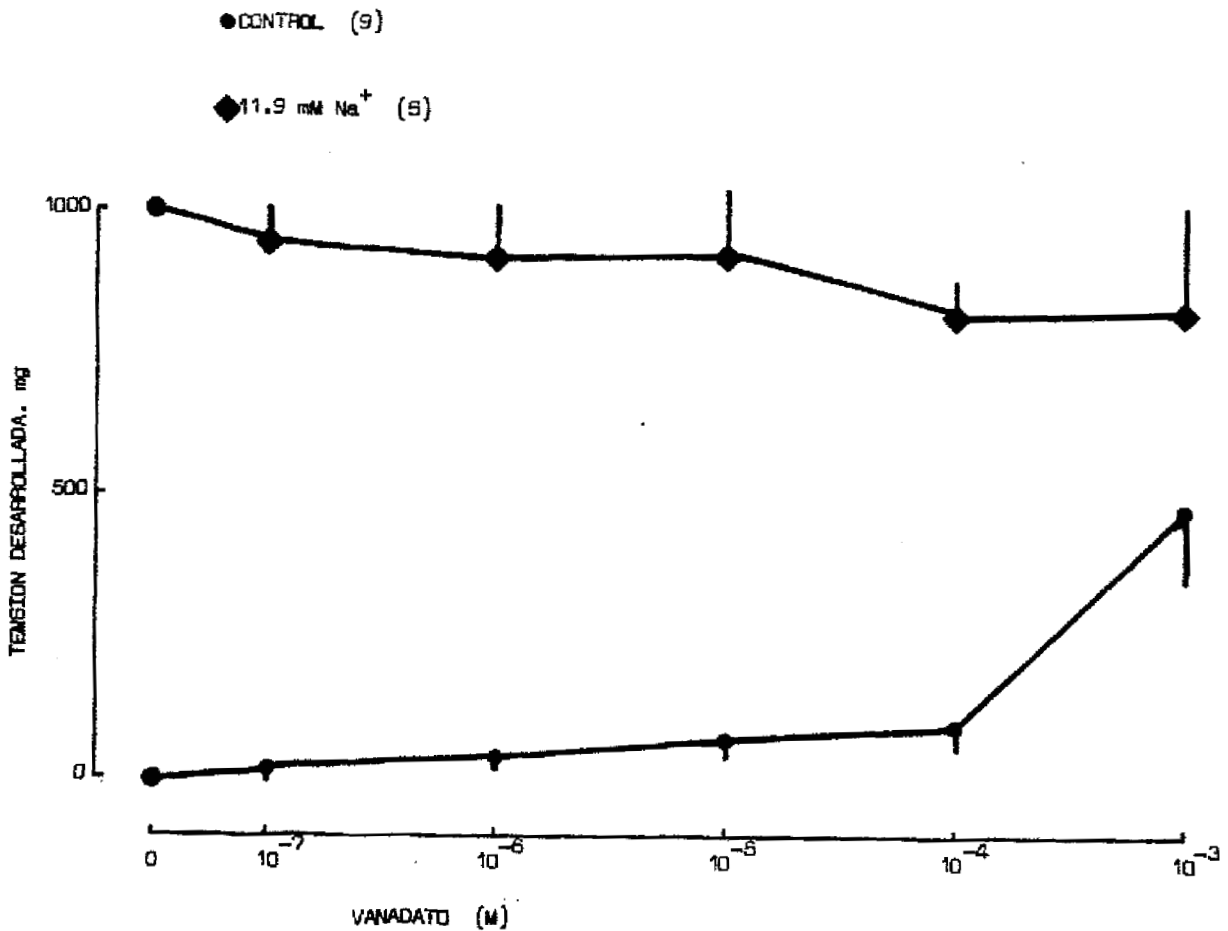


Fig. 36: Respuesta de las arterias femorales de gato al vanadato ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ ) tras 30 min de incubación en una solución con 11.9 mM de  $\text{Na}^+$ . La metodología y los símbolos utilizados son similares a los de la Fig. 35. La curva dosis-respuesta a vanadato en un medio normal se incluye como referencia, sin que se realizara tampoco su comparación estadística con la obtenida en sodio reducido.

sión que disminuyó posteriormente hasta quedar estabilizada alrededor de 1000 mg (Fig. 34). La ulterior adición de cuabajna o vanadato no ocasionó modificaciones suplementarias del tono (Figs. 35 y 36).



Influencia de la concentración extracelular de  $K^+$  sobre la  
contracción de las arterias cerebrales y femorales de gato

En este grupo de experimentos se analizó en primer lugar el efecto de la supresión de  $K^+$  del medio extracelular sobre el tono basal de las arterias cerebrales y femorales - de gato. Las Figuras 37 y 39 muestran que tal modificación no alteró de manera significativa esta tensión de reposo, observándose tan sólo ligeras oscilaciones de poca duración.

Por otra parte, en estas condiciones, las arterias fueron contraídas con  $10^{-5}$  M de noradrenalina y una vez alcanzado el techo de la vasoconstricción se añadieron al baño 7,5 mM de  $K^+$ , lo que ocasionó una marcada vasodilatación, tanto en los vasos cerebrales como en los femorales (Figs. 37 y 39). Con objeto de veriguar la participación de la bomba de sodio en este fenómeno, se administraron dos conocidos agentes bloqueantes de la misma, ouabaina ( $10^{-4}$  M) o vanadato ( $10^{-3}$  M), previamente a la adición de noradrenalina. En tales circunstancias, sólo la ouabaina fué capaz de antagonizar el efecto vasodilatador del potasio en este tipo de vasos (Figs. 37, 38, 39, 40).

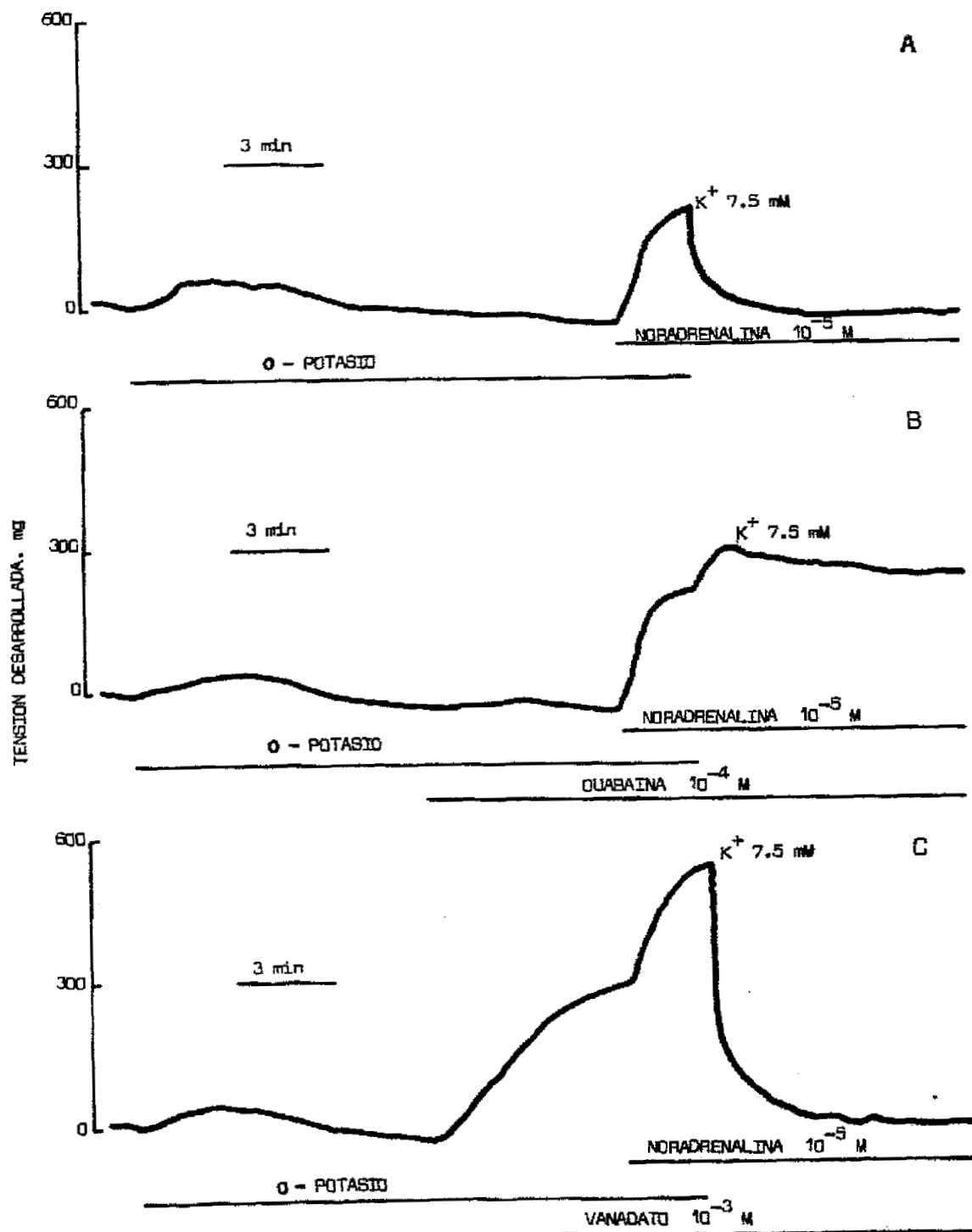


Fig. 37: Efecto de la supresión de potasio del medio extracelular y respuesta vasodilatadora de 7.5 mM de K<sup>+</sup> en arterias cerebrales de gato previamente contraídas con noradrenalina (10<sup>-5</sup> M), en ausencia (A) o presencia de ouabaina (B) o vanadato (C). Tras la exposición de los vasos a un medio carente de potasio, se administró a los mismos noradrenalina (A), ouabaina y noradrenali-

Fig. 37 (Cont.)

na (B) o vanadato y noradrenalina (C); una vez obtenida la respuesta máxima se añadieron al baño 7.5 mM de K<sup>+</sup>. La tensión desarrollada por las arterias está reflejada en ordenadas y el tiempo transcurrido en abscisas. Las líneas horizontales debajo de cada trazado indican el tiempo de exposición a las distintas soluciones o fármacos empleados. El experimento completo tuvo una duración de 25 min.

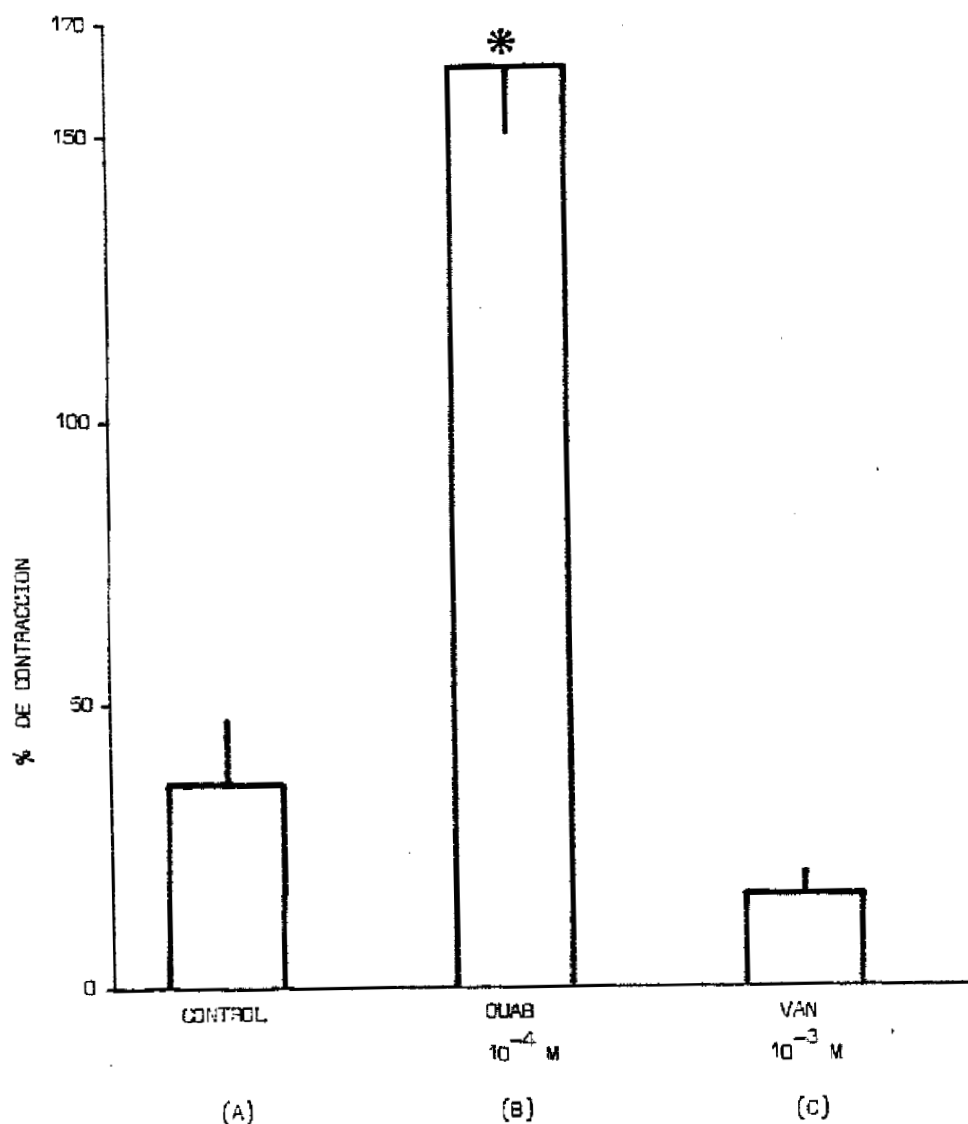


Fig. 38: Influencia de  $10^{-4}$  M de ouabaina (B) y  $10^{-3}$  M de vanadato (C) en la relajación inducida por 7.5 mM de  $K^+$  en arterias cerebrales de gato, previamente contraídas con noradrenalina ( $10^{-5}$  M). El experimento realizado está descrito en la Fig. 37. En ordenadas se representa el % de contracción, cuyo valor de 100% correspondió a la tensión máxima desarrollada por la noradrenalina en cada caso (A:  $364 \pm 13$  mg; B:  $259 \pm 17$  mg; C:  $572 \pm 48$  mg). El asterisco señala la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

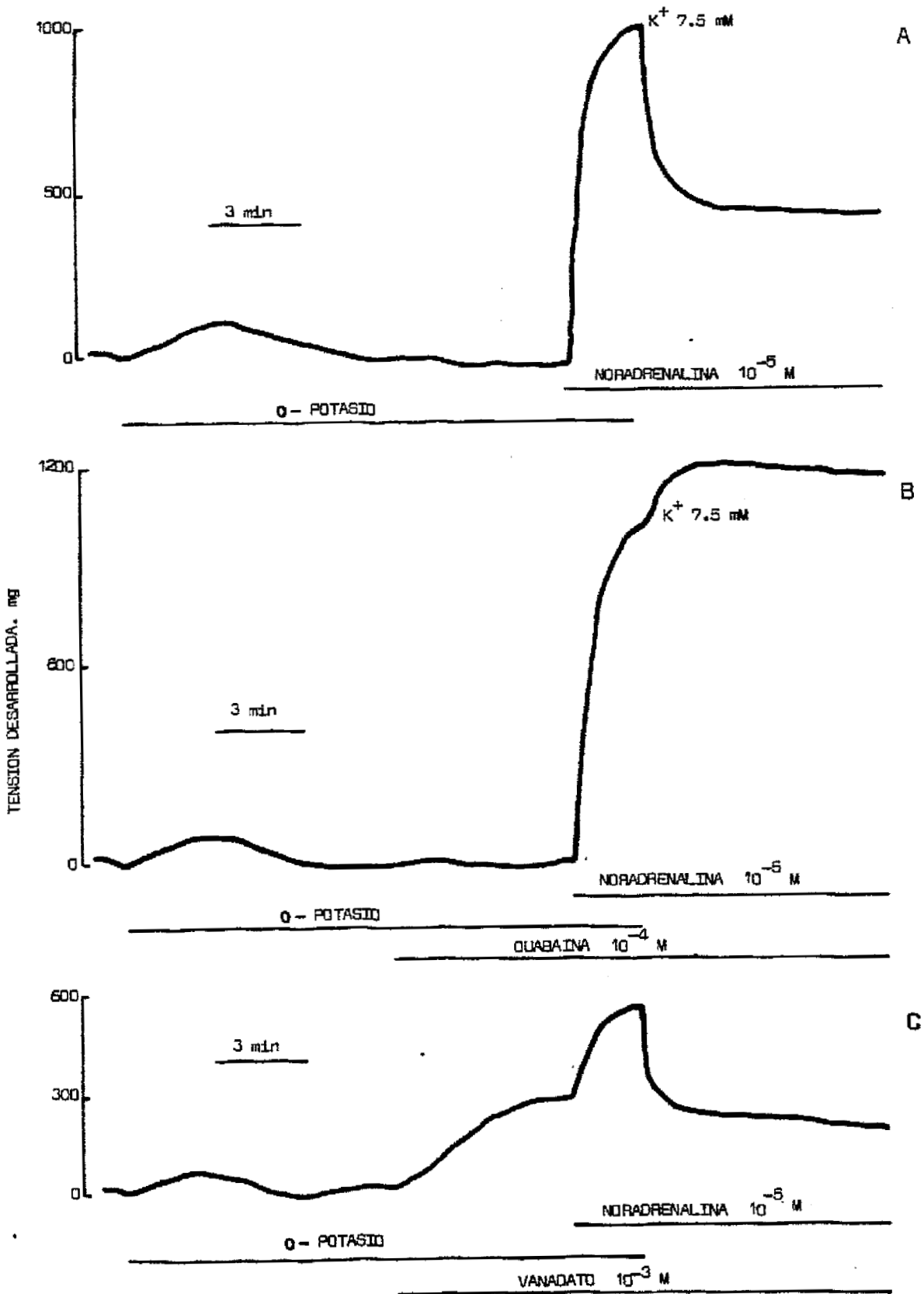


Fig. 39: Modelo representativo del efecto vasodilatador de  $K^+$  en arterias femorales de gato, incubadas en un medio libre de potasio, y previamente contraídas con  $10^{-5}$  M de noradrenalina (A). Efecto de  $10^{-4}$  M de ouabaina (B) y  $10^{-3}$  M de vanadato (C) sobre dicha acción relajadora. La metodología empleada y el modelo de representación usado son idénticos a los de la Figura 37.

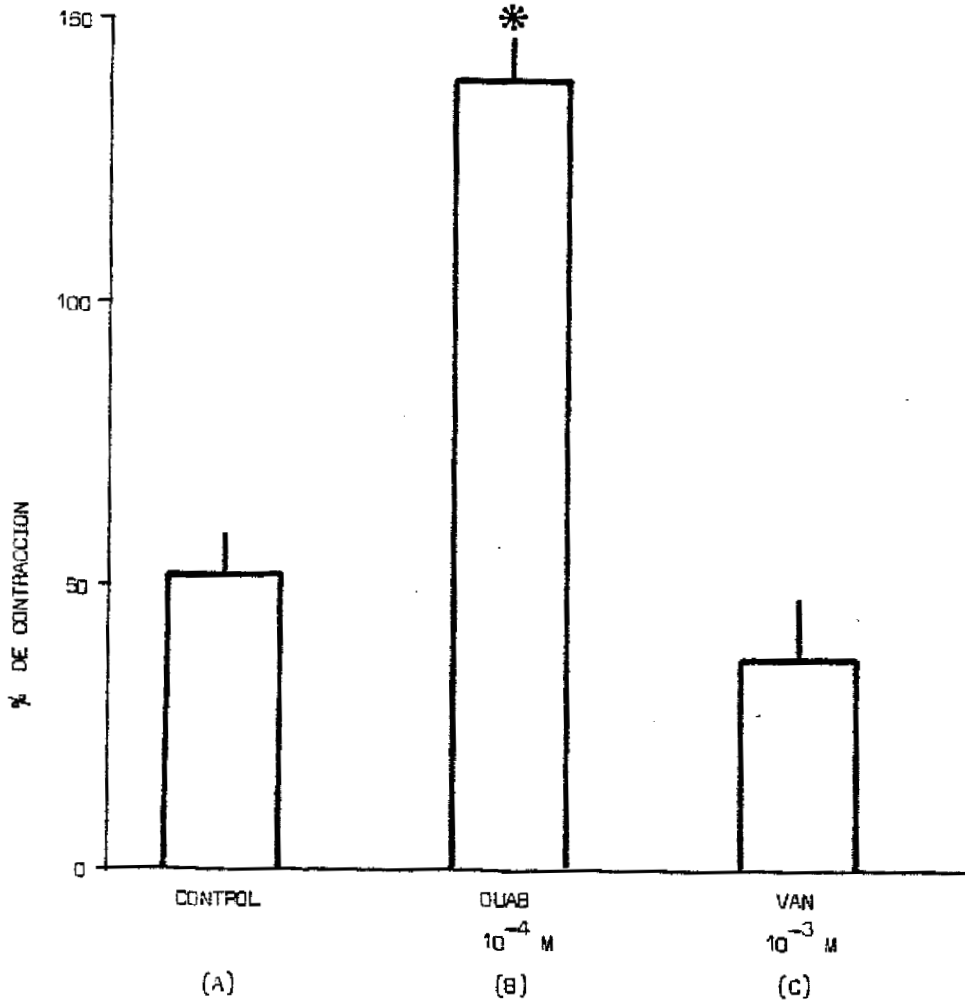


Fig. 40: Influencia de  $10^{-4}$  M de ouabaina (B) y  $10^{-3}$  M vanadato (C) sobre la vasodilatación inducida por 7,5 mM de  $K^+$  en arterias femorales de gato, previamente contraídas con noradrenalina ( $10^{-5}$  M). El experimento se describe en la Fig. 39. En ordenadas se representa el % de contracción; el 100% de la misma correspondió a la máxima vasoconstricción originada por la noradrenalina (A:  $953 \pm 61$  mg; B:  $994 \pm 73$  mg; C:  $556 \pm 41$  mg). El asterisco indica la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

## LIBERACION DE H<sup>3</sup>-NORADRENALINA

### Flujo espontáneo de tritio

Con objeto de investigar la capacidad de ouabaina y vanadato para liberar noradrenalina de las terminaciones nerviosas adrenérgicas perivasculares de arterias cerebrales y femorales de gato, los tejidos se incubaron durante 60 min en un medio que contenía H<sup>3</sup>-noradrenalina ( $2 \times 10^{-7} M$ ), para marcar los depósitos endógenos de catecolaminas. A continuación, las arterias se perfundieron con <sup>una</sup> solución Krebs-Hanseleit durante 100 min con el fin de lavar los tejidos del exceso de radioactividad fijada en lugares inespecíficos, que de otro modo hubieran enmascarado los resultados. El flujo espontáneo de tritio que se obtuvo durante este proceso se recogió en algunos experimentos, y puede observarse en las Figs. 41 y 42. Como puede apreciarse en ellas, la secreción de radioactividad de las arterias cerebrales y femorales decayó rápidamente en los primeros minutos de lavado, quedando estabilizada a los 40 ó 50 min de perfusión. El tritio recogido en el minuto 100 se consideró como liberación basal, y las variaciones en el flujo de radioactividad inducidas por ouabaina o vanadato se refirieron siempre a ella (expresadas en % de esta secreción).

En determinados experimentos se modificó la concentración iónica del medio extracelular (suprimiendo el Ca<sup>2+</sup> o reduciendo el Na<sup>+</sup> a 11.9 mM). Las nuevas soluciones comenzaron

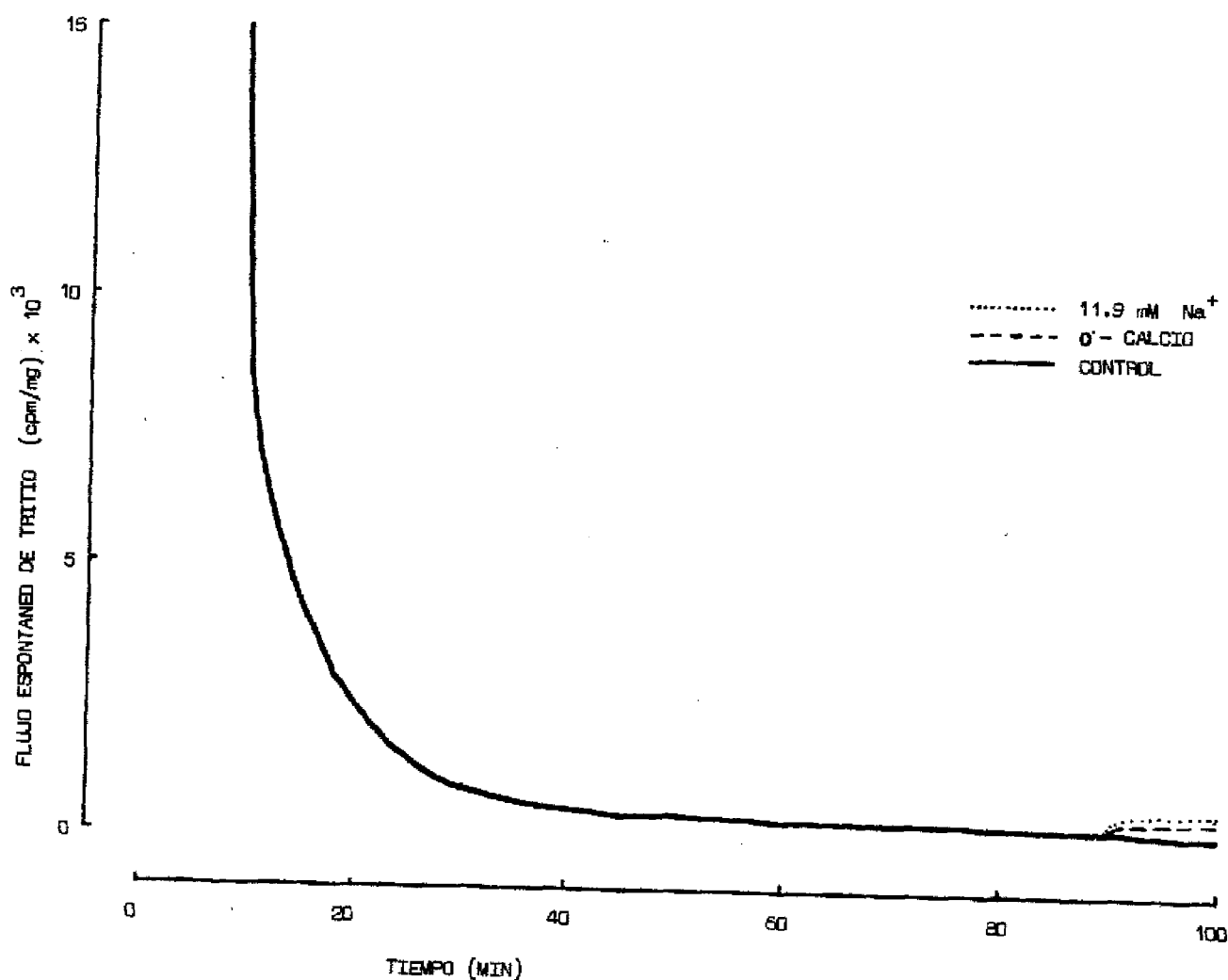


Fig. 41: Modelo de la liberación espontánea de tritio en arterias cerebrales de gato, incubadas previamente con H<sup>3</sup>-Nora drenalina ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 60 min. En ordenadas se representa la radioactividad recogida en el medio (cuentas por minuto/mg de tejido) y en abscisas el tiempo de lavado. Las líneas discontinuas corresponden a la introducción de soluciones a las que se ha reducido el Na<sup>+</sup> a 11.9 mM o suprimido el Ca<sup>2+</sup>.



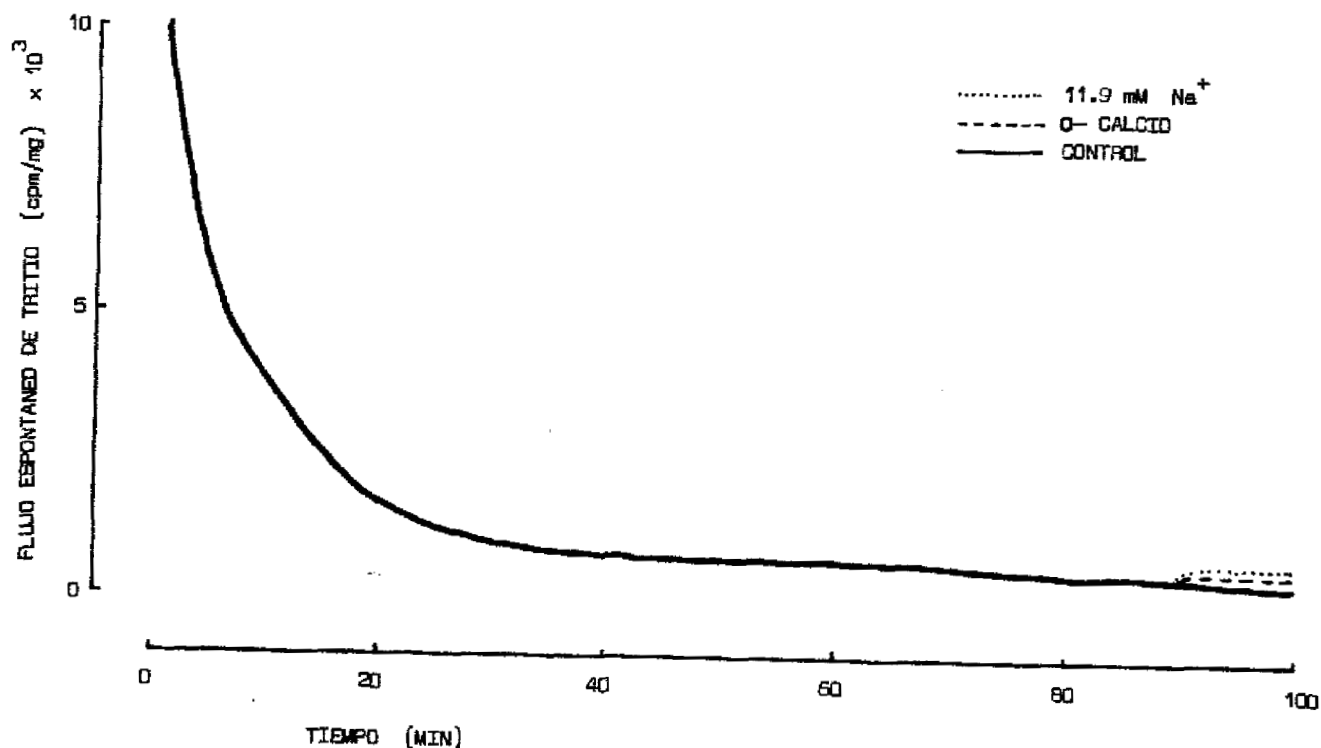


Fig. 42: Modelo de la liberación espontánea de radioactividad en arterias femorales de gato, incubadas anteriormente con  $H^3$ -Noradrenalina ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 60 min. El tritio liberado (cpm/mg de tejido) se representa en ordenadas y el -- tiempo de lavado en abscisas. Las líneas discontinuas corresponden a la perfusión del medio bajo en sodio (11.9 mM) o libre de calcio.

a perfundirse tras 90 min de lavado con Krebs-Hanseleit; en ambos casos se produjo una discreta elevación del flujo de -- tritio liberado espontáneamente (Figs. 41 y 42).

Liberación de  $H^3$ -Noradrenalina en arterias cerebrales y femorales de gato inducida por ouabaina

Transcurridos 100 min de lavado, y obtenida la secreción basal de radioactividad, se añadió al medio de perfusión ouabaina ( $10^{-4}$  M), y se recogió el efluente cada 3 min, durante un período total de 30 min.

En las arterias cerebrales de gato, la ouabaina produjo un significativo incremento de la liberación de tritio, que alcanzó su punto máximo a los 18 min de introducir el fármaco (Fig. 43). Por el contrario, la radioactividad emitida por las arterias femorales no fué modificada por la administración del digitálico (Fig. 44).

En los vasos cerebrales, la omisión de  $Ca^{2+}$  extracelular anuló la liberación de tritio inducida por ouabaina, mientras que la reintroducción de este ión dió lugar a la recuperación de la misma (Fig. 45). Sin embargo, la supresión de calcio no supuso cambio significativo alguno en el comportamiento de las arterias femorales (Fig. 47). La rápida disminución de la secreción total de radioactividad que puede -- apreciarse en ambos tipos de arterias en el momento de la reintroducción del  $Ca^{2+}$ , tanto en presencia de ouabaina como en los controles, parece corresponder a las variaciones del flujo basal de tritio ocasionadas por el cambio del medio iónico. Por otra parte, la reducción de la concentración de  $Na^+$  (11.9 mM) en el medio extracelular produjo un marcado aumento

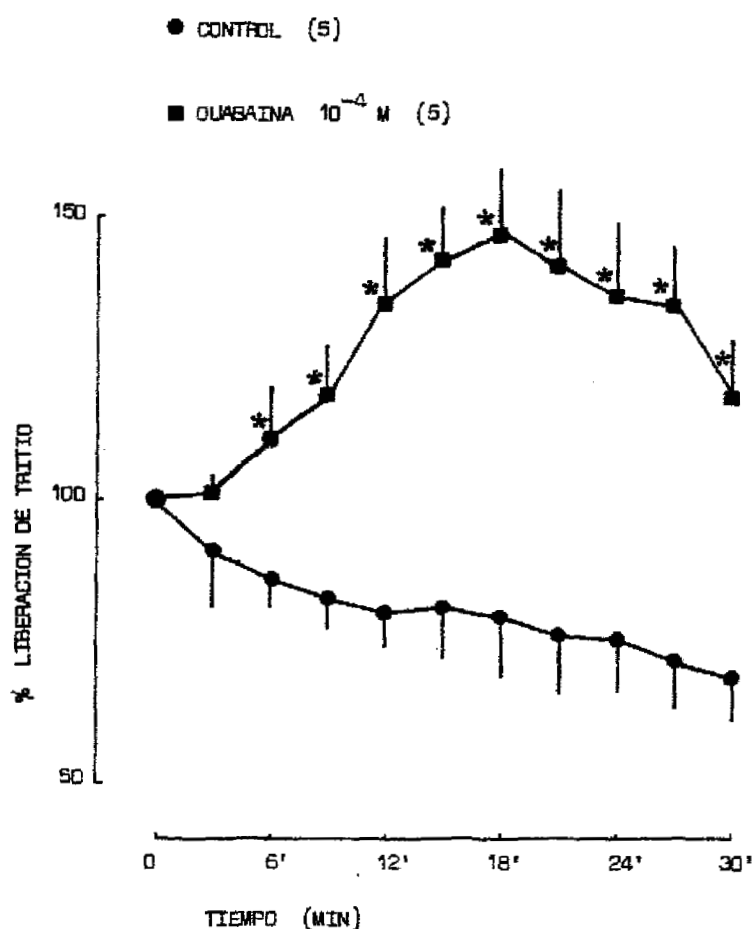


Fig. 43: Liberación de tritio en arterias cerebrales de gato inducida por ouabaina ( $10^{-4}$  M). En ordenadas se representa la radioactividad liberada, expresada en % de secreción basal. Los puntos corresponden a la media aritmética y las líneas verticales al error estándar. El promedio de los distintos valores tomados como 100% fué de  $368 \pm 23$  cpm/mg. El tiempo de perfusión se refleja en abscisas. Los asteriscos indican la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ). Las cifras entre paréntesis señalan los experimentos realizados.

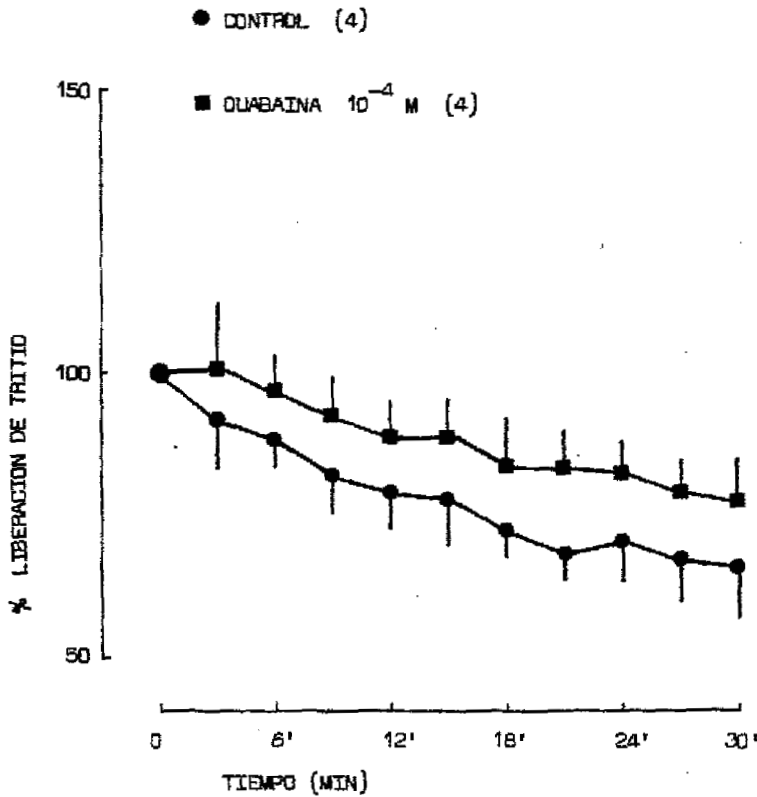


Fig. 44: Flujo de radioactividad emitido por las arterias femorales en ausencia y en presencia de ouabaina ( $10^{-4}$  M). El % de tritio liberado se expresa en ordenadas y el tiempo transcurrido en abscisas. Cada punto representa la media aritmética de secreción de  $H^3$  y las barras verticales el error estándar de la misma. El valor de 100%, fué de  $312 \pm 19$  cpm/mg. Los experimentos realizados se muestran entre paréntesis.

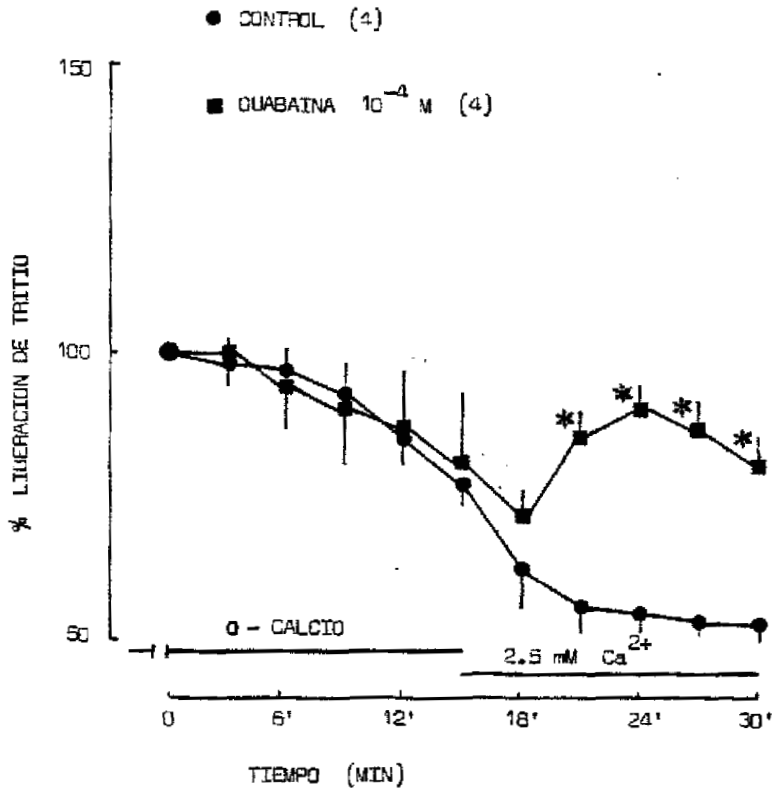


Fig. 45: Efecto de la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre la liberación de tritio inducida por  $10^{-4}$  M de ouabaina en arterias cerebrales de gato. La solución exenta de calcio se introdujo 10 min antes de añadir el fármaco. Tras 15 min de perfusión en estas condiciones se reintrodujo de nuevo el  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular hasta el final del experimento. Cada punto representa la media aritmética de la secreción obtenida y las barras verticales el error estándar. El % de liberación se muestra en ordenadas, con un valor de 100% equivalente a  $406 \pm 16$  cpm/mg, y el tiempo transcurrido figura en abscisas. Las líneas horizontales indican los períodos de exposición a los distintos medios. Los asteriscos señalan la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

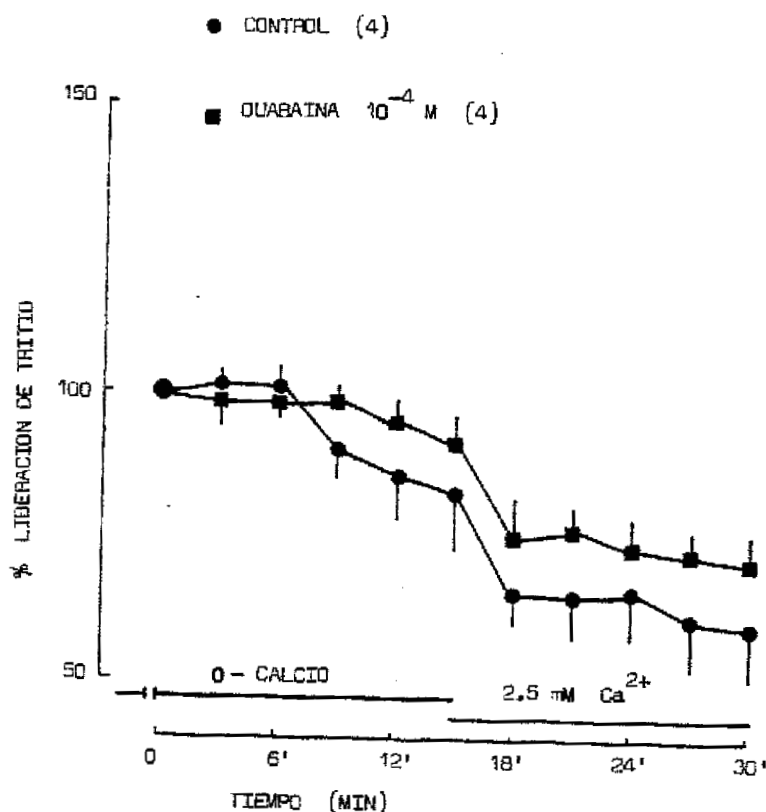


Fig. 46: Influencia del  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la liberación de tritio inducida por ouabaina ( $10^{-4}$  M) en arterias femorales de gato. La metodología, los símbolos y la representación de la figura son idénticos a los de la Fig. 45. El valor de 100% correspondió a un promedio de  $347 \pm 14$  cpm/mg.

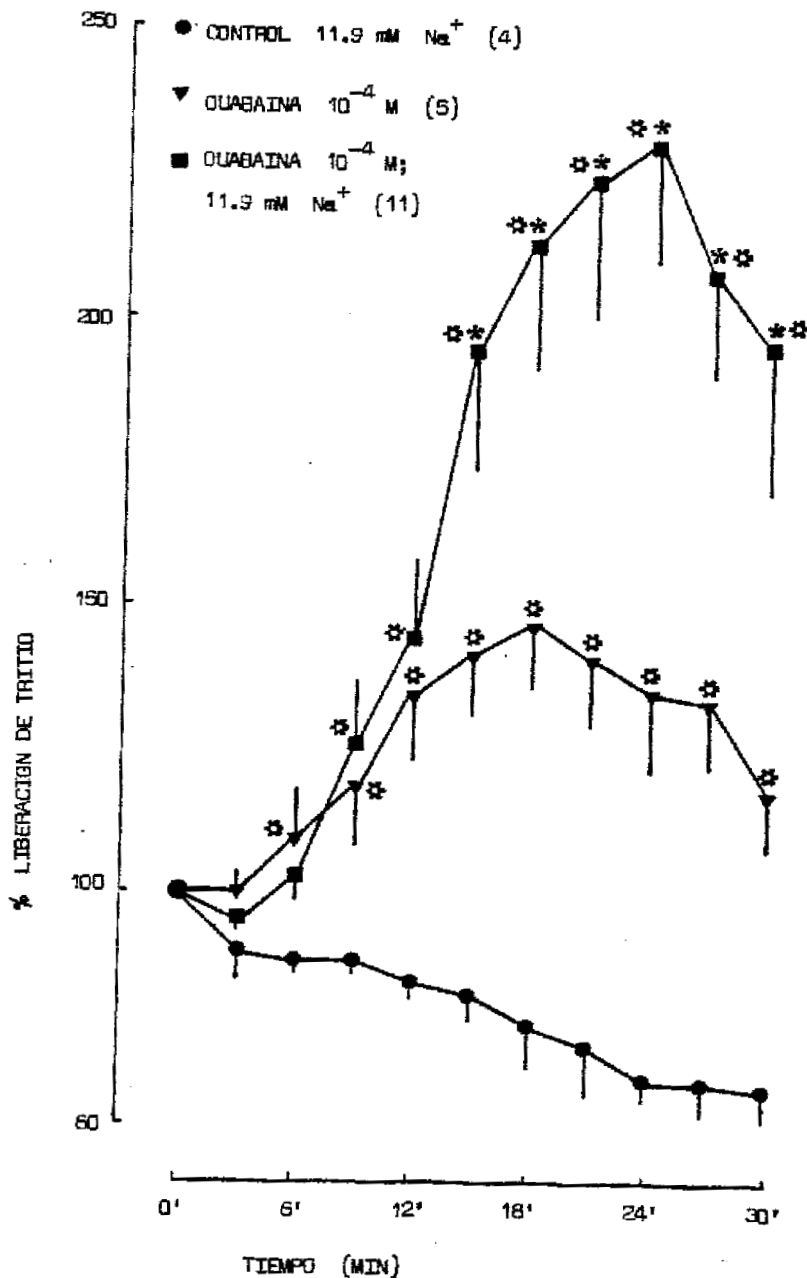


Fig. 47: Comparación del efecto de  $10^{-4}$  M de ouabaina sobre la liberación de radioactividad en arterias cerebrales de gato incubadas en Krebs-Hanseleit o en un medio con 11.9 mM de Na<sup>+</sup>. El flujo de tritio aparece en ordenadas, con un valor de 100% equivalente a  $461 \pm 23$  cpm/mg, y el tiempo de perfusión en abscisas. Cada punto refleja la media aritmética de la secreción y las barras verticales el error estándar. Los números entre paréntesis corresponden a los experimentos realizados. El asterisco (\*) indica la significación estadística de la curva (■) respecto de (▼), mientras que el asterisco (\*\*) señala la de ambas curvas experimentales con respecto a la control (●) ( $p \leq 0,05$ ).



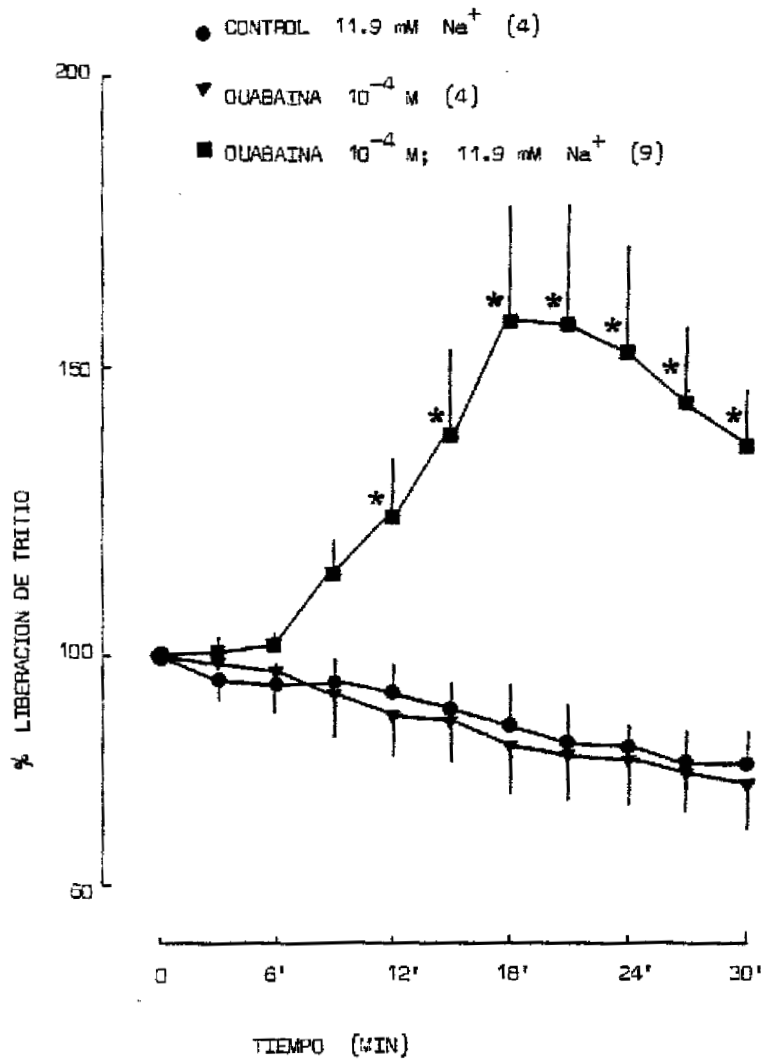


Fig. 48: Comparación del efecto de  $10^{-4}$  M de ouabaina sobre la liberación de radioactividad en arterias femorales de gato incubadas en Krebs-Hanseleit o en un medio con 11.9 mM de Na<sup>+</sup>. El % de secreción de tritio figura en ordenadas, con un valor de 100% equivalente a  $353 \pm 26$  cpm/mg, mientras que el tiempo transcurrido se aprecia en abscisas. Las cifras entre paréntesis señalan el número de experimentos. Los asteriscos indican la existencia de significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

de la capacidad de ouabaina para liberar tritio de las arterias cerebrales (Fig. 47), y facilitó la aparición de una netable secreción de radioactividad en las arterias femorales, inexistente anteriormente (Fig. 48).

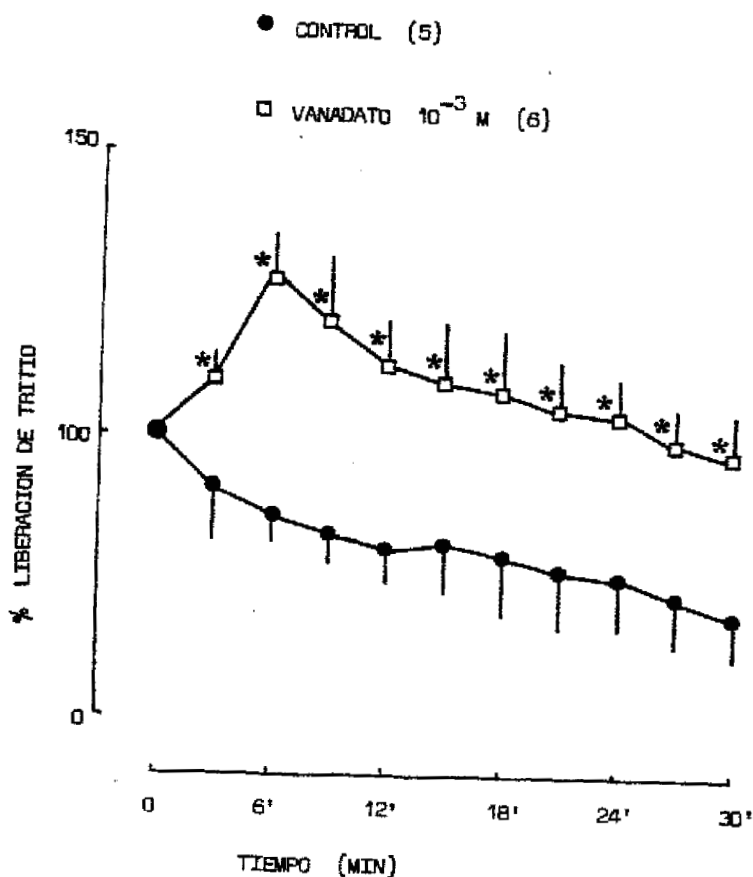


Fig. 49: Efecto de vanadato ( $10^{-3}$  M) sobre la liberación de tritio en arterias cerebrales de gato. En ordenadas se representa la secreción de  $H^3$  obtenida en % de liberación; el valor de 100% fué de  $368 \pm 23$  cpm/mg. El tiempo de perfusión se muestra en abscisas. Los puntos corresponden a la media aritmética de la liberación y las barras verticales al error estándar. Las cifras indican los experimentos realizados. Los asteriscos señalan la significación estadística respecto a los controles ( $p \leq 0,05$ ).

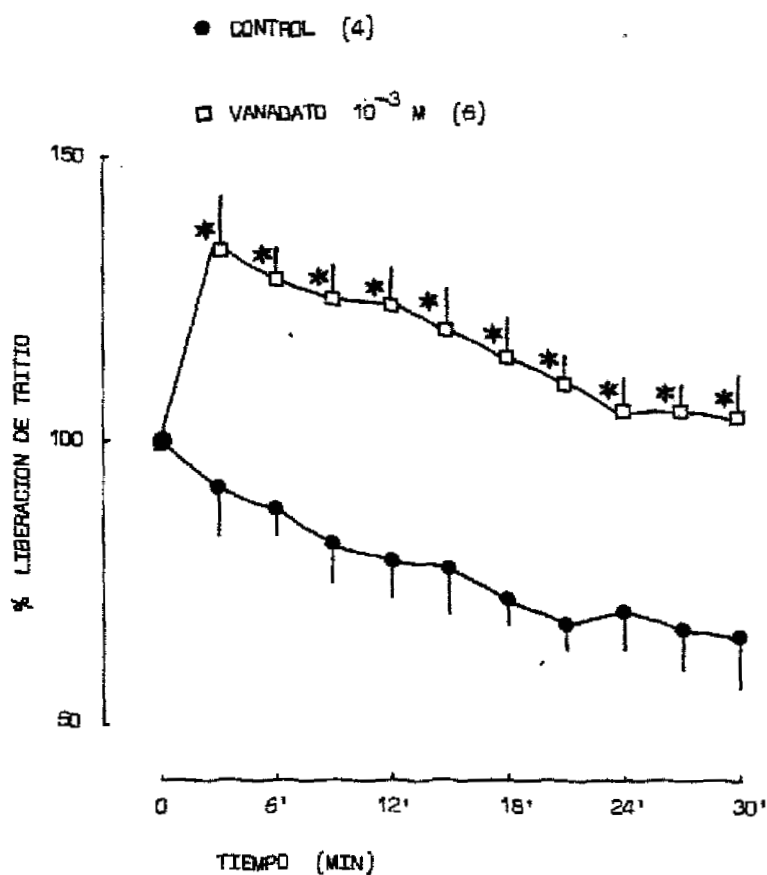


Fig. 50: Efecto de vanadato ( $10^{-3}$  M) sobre el flujo de  $H^3$  secretado por las arterias femorales de gato. La metodología y los símbolos empleados son análogos a los de la Fig. 49. - - La media de los distintos valores tomados como 100% fué de  $312 \pm 19$  cpm/mg. Los asteriscos representan la significación estadística ( $p \leq 0,05$ ).

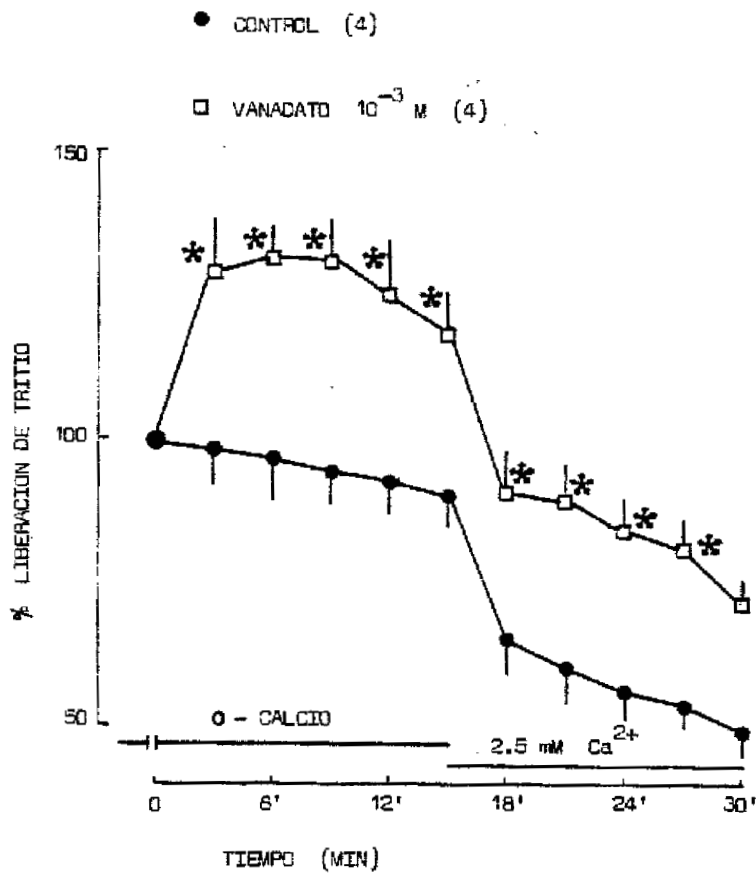


Fig. 51: Efecto de la supresión de Ca<sup>2+</sup> extracelular sobre la liberación de radioactividad evocada por 10<sup>-3</sup> M de vanadato - en arterias cerebrales de gato. Los experimentos realizados y la representación efectuada son análogos a los mostrados en - la Fig. 45. El valor de 100% de secreción era equivalente a 406 ± 16 cpm/mg. Los asteriscos indican la significación estadística (p ≤ 0,05).

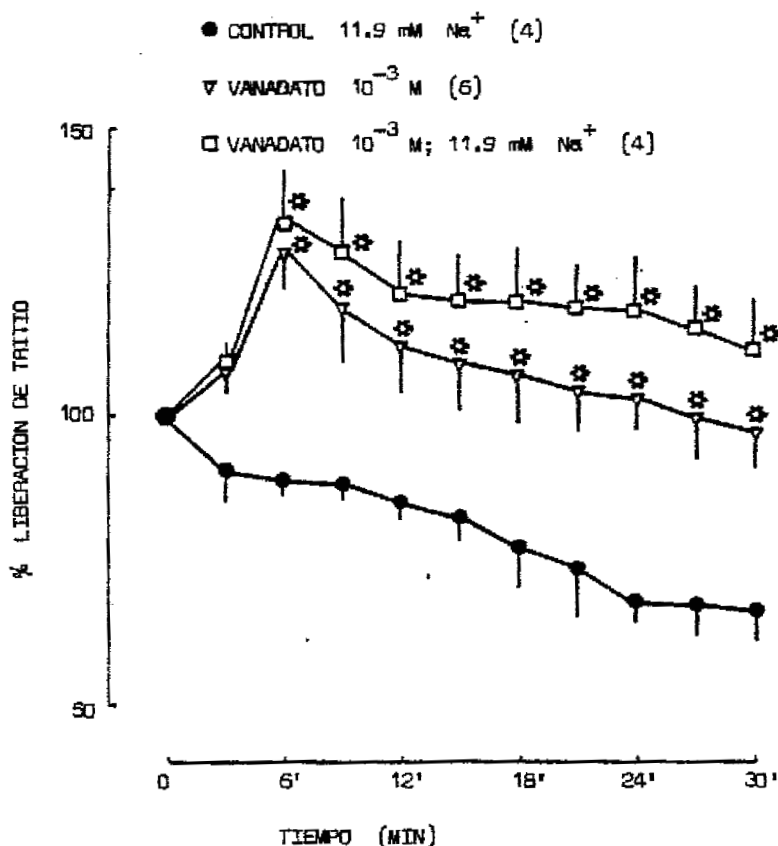


Fig. 53: Comparación del efecto de  $10^{-3}$  M de vanadato sobre la liberación de tritio en arterias cerebrales de gato incubadas en Krebs-Hanseleit o en un medio con 11.9 mM de Na<sup>+</sup>. El flujo de radioactividad aparece en ordenadas, con un valor de 100% equivalente a  $461 \pm 23$  cpm/mg, y el tiempo transcurrido se muestra en abscisas. Los puntos corresponden a la media aritmética de la secreción y las líneas verticales al error estándar. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados, y los asteriscos la significación estadística de las curvas experimentales respecto a la control ( $p \leq 0,05$ ).

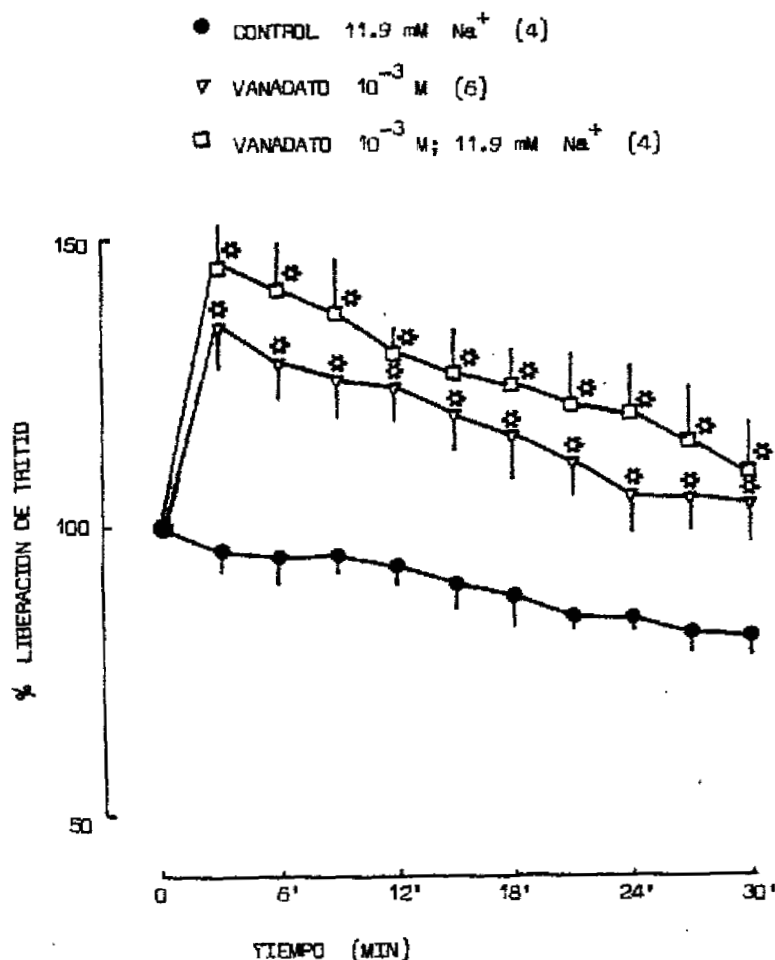


Fig. 54: Comparación del efecto de  $10^{-3}$  M de vanadato sobre la secreción de radioactividad en arterias femorales de gato incubadas en Krebs-Hanseleit o en un medio con 11.9 mM de Na<sup>+</sup>. El % de liberación de tritio figura en ordenadas, con un valor de 100% equivalente a  $353 \pm 26$  cpm/mg. El tiempo se representa en abscisas. Las cifras entre paréntesis señalan el número de experimentos, y los asteriscos la significación estadística - de las curvas experimentales respecto a la control ( $p \leq 0,05$ ).

DISCUSSION



Efecto de ouabaina y vanadato en la contracción vascular

Se ha comprobado que los digitálicos inducen respuestas vasoconstrictoras en diferentes vasos periféricos (55, 56, 57, 62, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79), siendo esta respuesta dependiente no sólo de la especie animal objeto de estudio, sino, dentro de la misma especie, del lecho vascular investigado (57, 62, 77). También se ha observado que la contracción inducida por ouabaina u otros cardiotónicos posee en general un doble componente: uno directo sobre la célula muscular lisa, y otro adrenérgico indirecto, mediado por la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares, la cual produce la respuesta vasoconstrictora al actuar sobre los receptores alfa-adrenérgicos (57, 77, 91). Además, la participación de cada uno de estos componentes en la respuesta contráctil también depende de la especie animal estudiada. Así, la vasoconstricción inducida por ouabaina en arterias periféricas de rata, conejo, perro o mono es en gran parte dependiente de la integridad de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, pudiendo ser bloqueada por los antagonistas alfa-adrenérgicos (56, 57, 62, 78). Sin embargo, la contracción producida por los cardiotónicos en vasos periféricos de cobayo u hombre es fundamentalmente debida al efecto directo de estos fármacos sobre el músculo liso vascular (57, 79).

Se han intentado explicar los diferentes mecanismos de acción de <sup>la</sup> ouabaina en los distintos lechos vasculares bien

por la distinta sensibilidad de la bomba de sodio de cada especie a la inhibición por los digitálicos (24, 31), por la existencia de diversas cantidades de ATPasa por micrómetro cuadrado de membrana (77), o por la variable densidad de la inervación simpática de los vasos (56, 57, 62, 77). Todos estos hechos nos indican la complejidad del estudio de los mecanismos de acción íntimos de los cardiotónicos a nivel del lecho vascular, y más concretamente en las arterias cerebrales, por las características especiales que tienen este tipo de vasos (62, 153).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la ouabaina produce respuestas vasoconstrictoras en arterias cerebrales y femorales de gato, siendo la contracción desarrollada en estas últimas dependiente de la dosis de cardiotónico empleada (Fig. 10). Sin embargo, en los vasos cerebrales el digitálico originó incrementos de tensión de carácter transitorio, alcanzando la respuesta máximo a  $3 \times 10^{-6}M$ , para, a partir de esta concentración, iniciarse la relajación de las arterias hasta alcanzar el tono basal (Figs. 3 y 4). Se ha sugerido que este tipo de respuesta puede ser debida a la liberación del neurotransmisor adrenérgico, que de manera pasajera produce el aumento de tensión vascular (57, 78). No obstante, éste no es el mecanismo de la respuesta observada en arterias cerebrales de gato, dado que el tratamiento previo de los animales con reserpina o la administración de fenotolamina no modificaron significativamente la vasoconstricción

inducida por ouabaina (Figs. 5 y 6) aunque se ha descrito que la fentolamina tiene cierta dificultad para bloquear el efecto de las catecolaminas endógenas en este tipo de vasos (157, 158). Por el contrario, la contracción obtenida en las arterias femorales sí estaba mediada, al menos parcialmente, por la liberación de noradrenalina de las varicosidades simpáticas, ya que fué notablemente reducida por el pretratamiento de los gatos con reserpina o la adición de fentolamina al medio (Figs. 11 y 12). Análogos resultados han sido hallados por otros investigadores en vasos periféricos (56, 57, 62, 78). Además, se ha observado que las arterias cerebrales parecen más sensibles a la acción de la ouabaina que las femorales, ya que la respuesta obtenida en las primeras a  $10^{-7}$  M (Fig. 4) sólo es alcanzada por las segundas en concentraciones diez veces superiores (Fig. 10). Similares resultados han sido encontrados en arterias cerebrales y mesentéricas de perro (62).

Por otro lado, la supresión del  $Ca^{2+}$  del medio extracelular abolió prácticamente la contracción inducida por ouabaina en ambos tipos de arterias (Figs. 8 y 13), lo que indica que la presencia de este catión es necesaria para obtener respuestas contráctiles con los digitálicos, confirmando con ello los experimentos realizados por otros autores en diversos lechos periféricos (75, 76, 77, 91). El mecanismo por el que la ouabaina origina la vasoconstricción, tanto en su acción directa como en su efecto adrenérgico indirecto, parece estar

basado en su capacidad de inhibir la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  dependiente, localizada en las células musculares lisas vasculares o en las terminaciones nerviosas simpáticas (77, 91). Se ha sugerido que la elevación del contenido de sodio intracelular, secundario a esta inhibición, invierte el sentido habitual del sistema de intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  en ambas estructuras, y provoca la irrupción de una corriente de calcio hacia el interior celular, que en última instancia es la desencadenante del proceso contráctil o la exocitosis de noradrenalina (91). Este mecanismo no utiliza los canales de calcio voltaje-dependiente (41), y ello explica que en algunos vasos, en nuestro caso las arterias femorales (Fig. 14) los antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  no sean capaces de antagonizar la contracción inducida por los digitálicos (75, 76). Sin embargo, el verapamil prácticamente anuló la respuesta producida por ouabaina en arterias cerebrales (Fig. 7), lo que parece indicar que en estos vasos el cardiotónico puede tener un mecanismo distinto para introducir el  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Además, se ha observado también que la nifedipina, otro bloqueante de calcio, inhibe la acción constrictora directa de la digoxina en arterias y venas crurales humanas (79). Tales hechos sugieren que en ciertos tipos de vasos el incremento de tono originado por los digitálicos no está mediado por el intercambio de  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  antes citado, sino que, probablemente, está en relación con fenómenos depolarizantes de membrana en la célula muscular lisa vascular, con la consiguiente apertura de los canales de calcio

dependientes del voltaje (62, 79, 82, 92). Es necesario señalar que la mayor sensibilidad de algunos vasos a los efectos de los digitálicos parece corresponder a este tipo de respuestas, sensibles al bloqueo con verapamil, mientras que la contracción mediada por el sistema de intercambio  $\text{Na}^{\dagger}-\text{Ca}^{2\dagger}$  sólo puede inducirse a dosis superiores (62, 79).

El descubrimiento de que los compuestos de vanadio tienen una gran capacidad para inhibir la actividad enzimática de la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger}-\text{K}^{\dagger}$  dependiente en diversos tejidos (13, 105, 106) ha despertado el interés de los investigadores por el estudio de los efectos de estos agentes sobre el músculo liso vascular. Desde el punto de vista bioquímico, la ATPasa extraída de los vasos es igualmente susceptible de inhibición por los compuestos de vanadio que la enzima proveniente de otros tejidos (159, 160). La capacidad del vanadio para bloquear la bomba de sodio se ha relacionado con el grado de oxidación de este elemento, de tal modo que la mayor actividad en este sentido se ha encontrado en el vanadio  $+5$ , mientras que la reducción a  $+4$  ó  $+3$  la disminuye considerablemente - - (104). Por tanto, cabría suponer que, de producir el vanadio vasoconstricción y ser ésta secundaria a la inhibición de la ATPasa, serían más eficaces para ello los compuestos en los que el elemento se hallara en su máximo estado de oxidación - (V  $+5$ ). Los cuatro diferentes compuestos de vanadio utilizados en este trabajo indujeron respuestas contráctiles en arterias cerebrales y femorales de gato, que fueron dependientes

de la dosis administrada (Figs. 15, 16, 21 y 22), aunque la concentración precisa para obtener una respuesta de cierta intensidad fué unas cien veces superior a la descrita como necesaria para inhibir la ATPasa en preparados de enzima aislada (159, 160). Pese al distinto grado de oxidación de los diversos compuestos de vanadio empleados (vanadato sódico,  $V + 5$ ; sulfato de vanadio,  $V + 4$ ; cloruro de vanadio,  $V + 3$ ; óxido de vanadio,  $V + 5$ ), no se observaron apenas modificaciones significativas en la contracción desarrollada por cada uno de ellos, salvo la inducida por óxido de vanadio, cuyo estado de oxidación es  $+5$ , que fué algo más reducida (Figs. 15, 16, 21 y 22), probablemente debido a dificultades de solubilización de este compuesto. Dada la semejanza de resultados en los siguientes experimentos se utilizó el vanadato sódico como representante de este grupo de fármacos. Similares respuestas contráctiles han sido halladas en vasos periféricos de rata (124), perro (125), cobayo (161), conejo o buey (160).

El incremento de tono inducido por vanadato no requirió, aparentemente, la mediación de las terminaciones nerviosas adrenérgicas; tanto el bloqueo de los receptores alfa-adrenérgicos como fentolamina (Figs. 17 y 23), como el tratamiento previo de los animales con reserpina (Figs. 18 y 24) no modificaron significativamente los efectos constrictores de este fármaco en arterias cerebrales o femorales de gato. Análogos resultados han sido hallados por otros autores en preparacio-

nes de músculo liso vascular (125, 151, 161) y no vascular (126). Dicha contracción fué en gran parte dependiente del calcio extracelular (Figs. 20 y 26), lo que indica que el proceso se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio a través de la membrana, confirmando con ello las observaciones realizadas por otros investigadores (151, 159, 160, 161). Por otro lado, el bloqueo de los canales de calcio con verapamil no alteró de manera importante el aumento de tensión inducido por vanadato en los dos tipos de vasos estudiados (Fig. 19 y 23), hecho que sugiere que tales estructuras no participan en los efectos vasculares de este fármaco. Sin embargo, la vasoconstricción evocada por vanadato en aorta de cobayo o conejo -- (160, 161), así como en conducto deferente de rata (126), es bloqueada parcialmente por los antagonistas de calcio. Es posible que en esta diferente sensibilidad intervengan factores dependientes de la especie estudiada, puesto que en arteria renal de gato la respuesta contráctil producida por vanadato es, como en nuestros resultados, resistente a la acción del verapamil (151). En cualquier caso, la falta de datos que clarifiquen este tema es evidente, y sería útil la realización de nuevos experimentos en tal sentido.

Con objeto de averiguar si entre los efectos producidos por la ouabaina y el vanadato sobre el lecho vascular existe algún tipo de interacción, ambos fármacos se administraron conjuntamente a las arterias cerebrales y femorales de gato (Figs. 27, 28, 29 y 30). Este tipo de aplicación dió lu-

gar a una vasoconstricción que fué similar a la suma de las contracciones obtenidas por cada fármaco separadamente (vease Figs. 4, 10, 14 y 21), lo que indica que estos agentes no actúan en un mismo punto al inducir sus respectivas respuestas contráctiles. Sin embargo, algunos autores han encontrado en conducto deferente de rata, en unas condiciones experimentales parecidas, un antagonismo aparentemente no competitivo entre las acciones de los dos agentes (126).

Por último, se analizó la influencia de la reducción de  $\text{Na}^+$  ó  $\text{K}^+$  en el medio extracelular, conocidos métodos para disminuir la actividad de la bomba de sodio (11, 12), sobre el tono vascular de las arterias cerebrales y femorales - de gato, así como de la respuesta producida por ouabaina y vanadato en estas condiciones. La reducción de la concentración de sodio a 11.9 mM indujo una marcada pero transitoria vasoconstricción en ambos tipos de arterias (Figs. 31 y 34), probablemente debida a la entrada de calcio en el citoplasma mediada por el sistema de intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , como han sugerido Ozaki y Urakawa en aorta de cobayo (93). Esta respuesta transitoria alcanzó en las arterias cerebrales su máxima intensidad durante el primer minuto; posteriormente se produjo una acusada relajación, de tal forma que a los 10 min de incubación se recuperó la tensión inicial (Fig. 31). Sin embargo, las arterias femorales, que inicialmente se comportaron de manera similar, quedaron finalmente estabilizadas en unos 1000 mg por encima del tono basal original (Fig. 34). En estas con



diciones, la adición ulterior de ouabaina o vanadato no modificó esas tensiones residuales en ninguna de las arterias estudiadas (Figs. 32, 33, 35 y 36). Tales resultados podrían ser debidos a que la disminución del sodio extracelular hubiera bloqueado ya la ATPasa, de tal modo que la administración posterior de los agentes inhibidores de la misma resultara inefectiva.

Por otra parte, se pretendió investigar de modo directo el grado de actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  dependiente, tanto en las arterias cerebrales como en las femorales de gato, mediante el estudio de la relajación producida por el potasio, según el método descrito por Clinton Webb y Bohr (132). Para ello, los vasos se sometieron a un medio carente de  $\text{K}^+$  y, en estas condiciones, las arterias se contrañeron con noradrenalina; una vez alcanzado el techo de la respuesta contráctil se añadieron bajas concentraciones de potasio al medio (7,5 mM), lo que originó una significativa respuesta vasodilatadora. Esta relajación fué abolida por ouabaina en ambos tipos de vasos, pero no se modificó con el vanadato (Figs. 37, 38, 39 y 40). Puesto que la vasodilatación inducida por el potasio se considera un índice aceptable del grado de actividad de la ATPasa (130, 131, 132), nuestros resultados indican que los digitálicos pueden inhibir esta enzima, mientras que el vanadato no es efectivo para ello, al menos en estas condiciones experimentales. El hecho de que recientemente se haya sugerido que en la relajación producida por el potasio influyen - -

otros factores, además de la bomba de sodio, y que la incorporación de  $\text{Rb}^{86}$  es un método más fiable para medir la actividad de la ATPasa (162), no creemos que reste valor a los datos obtenidos en nuestros experimentos, aunque parece deseable su comprobación con estas nuevas técnicas. Por otra parte, al considerar las acciones del vanadato sobre el músculo liso hemos de tener en cuenta que el lugar de fijación de este agente a la bomba de sodio es de localización intracelular (112), por lo que se ha supuesto que la adición de estos compuestos al medio extracelular puede ser un método poco apropiado para inhibir la ATPasa, por la incapacidad del vanadato para atravesar la membrana (161), o que, caso de producirse cierta captación del fármaco, éste fuera ligado a las proteínas intracelulares o inactivado por los sistemas reductores citoplasmáticos (159). Como alternativa, se ha sugerido que las acciones vasoconstrictoras del vanadato pueden deberse a la interferencia de este fármaco con el "pool" de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la superficie de la membrana, y a la alteración de los movimientos celulares de calcio (117, 160), aún cuando la implicación de los canales de calcio en este proceso es discutible (151, 159, 160, 161). Sea como fuere, el posible papel fisiológico del vanadato en la regulación de la actividad de la bomba de sodio queda pendiente de precisar en nuevos estudios.

na, dada la poca potencia contráctil del neurotransmisor a este nivel (158, 163), predominaría el componente directo del cardiotónico sobre la célula muscular lisa vascular. Por otra parte, el vanadato originó un incremento pequeño pero rápido de la secreción de  $H^3$ -noradrenalina, tanto en las arterias cerebrales como en las femorales (Figs. 49 y 50). De todas formas, en las arterias utilizadas en el presente trabajo, ésta secreción no parece contribuir a la vasoconstricción inducida por vanadato, ya que tanto la administración de fentolamina como el pretratamiento con reserpina no modificaron dicha contracción (véase Figs. 17, 18, 23 y 24). No obstante, otros investigadores han encontrado en trozos de corteza cerebral de rata una cierta disminución de la liberación de noradrenalina, empleando concentraciones de vanadato parecidas - ( $10^{-3}M$ ) (103).

La dependencia del calcio extracelular en la secreción de noradrenalina es un factor esencial para determinar el carácter exocitótico de la liberación del neurotransmisor simpático, independientemente del estímulo utilizado (69, 164, 165). La liberación inducida por ouabaina en arterias cerebrales fué dependiente del  $Ca^{2+}$  extracelular (Fig. 45), mientras que en las arterias femorales no se modificó el nivel basal de radioactividad (Fig. 46). Tales resultados indican que en los vasos cerebrales la liberación inducida por cardiotónicos se realiza mediante un mecanismo exocitótico, de manera análoga a la establecida en otros tejidos (12, 65, 70, 98). Sin em

bargo, la liberación de tritio evocada por vanadato, en ambos tipos de vasos, no sufrió variación alguna por la omisión del calcio del medio extracelular (Figs. 51 y 52), lo que sugiere una secreción probablemente no exocitótica.

Por último, para averiguar si la entrada de calcio, y posterior exocitosis del neurotransmisor, inducida por ouabina podía estar relacionada con el sistema de intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ ; las arterias se incubaron en medio con 11.9 mM de sodio, y en estas condiciones se estudió el efecto secretor de noradrenalina por el cardiotónico, así como el inducido por vanadato. Teóricamente, la reducción de  $\text{Na}^+$  facilita la inversión del sentido normal de dicho intercambio, y origina la potenciación de la acción liberadora de los digitálicos (12, 64, 70). En efecto, en estas condiciones se observó, en arterias cerebrales y femorales de gato, un notable incremento del flujo de tritio evocado por ouabina (Figs. 47 y 48). Estos datos confirman los resultados obtenidos por otros autores en médula adrenal (64, 70), en el sentido de que la liberación de catecolaminas producida por ouabina es debida a la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  dependiente, localizada en nuestro caso en la varicosidad simpática, lo que origina una elevación del  $\text{Na}^+$  intracelular y la inversión del sistema de intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , con el consiguiente aumento de la concentración citoplasmática de calcio. Por el contrario, la reducción de sodio no modificó la secreción inducida por vanadato en ninguna de las arterias estudiadas (Figs. 53, 54), lo que sugiere que el mecanismo de esta liberación es diferente del que poseen los glucó

CONCLUSIONES

- 1.- La ouabina produjo incrementos de tensión en segmentos de arterias cerebrales y femorales de gato. La contracción alcanzada por este fármaco en arterias cerebrales fué de carácter transitorio, y no se modificó con la adición de fentolamina o por el tratamiento previo de los animales con reserpina, mientras que en las arterias femorales, la vasoconstricción fué dosis-dependiente y se redujo significativamente con fentolamina o el pretratamiento de los gatos con reserpina. Estos resultados indican la existencia de un importante componente adrenérgico indirecto sólo en las arterias femorales.
- 2.- La contracción originada por ouabaina en ambos tipos de arterias fué dependiente de la presencia de calcio extracelular. El verapamil no produjo cambios en el comportamiento de las arterias femorales frente al digitálico; sin embargo, anuló prácticamente la vasoconstricción ocasionada por este agente en los vasos cerebrales. Este hecho indica la participación de los canales de  $Ca^{2+}$  en dicha respuesta, que es probablemente causada por depolarización de la membrana de la célula muscular lisa.
- 3.- El vanadato sódico (V +5), el sulfato de vanadio (V +4), el cloruro de vanadio (V +3) y el óxido de vanadio (V +5) produjeron similares contracciones dosis-dependientes en arterias cerebrales y femorales de gato. Ni la administración de fentolamina ni el tratamiento con reserpina alteraron significativamente los efectos contráctiles del va-

nadato sódico en estos vasos. La supresión del calcio extracelular redujo marcadamente estas acciones que, en cambio, no fueron modificadas por el verapamil.

- 4.- La adición conjunta de ouabaina y vanadato en ambos tipos de arterias, originó una vasoconstricción aproximadamente equivalente a la suma de las respectivas respuestas contráctiles, obtenidas por separado.
- 5.- La reducción de la concentración extracelular de sodio a 11.9 mM ocasionó notables contracciones de carácter transitorio, en arterias cerebrales y femorales de gato. Sin embargo, en estas condiciones, ouabaina y vanadato no produjeron respuestas contráctiles.
- 6.- La relajación inducida por el potasio en arterias cerebrales y femorales contraídas con noradrenalina en un medio sin  $K^+$ , índice del grado de actividad de la bomba de sodio, fué abolida por ouabaina en ambos tipos de vasos, - pero no resultó alterada por el vanadato, lo que indica - que las acciones de este agente a nivel vascular no están mediadas por la inhibición de la ATPasa  $Na^+-K^+$  dependiente.
- 7.- Todos estos hechos parecen indicar que el incremento del tono vascular inducido por ouabaina se realiza a través del bloqueo de la bomba de sodio, mientras que el vanadio actúa por un mecanismo distinto, de naturaleza no bien conocida, sin relación directa con la ATPasa de membrana.

- 8.- La ouabaina liberó  $H^3$ - noradrenalina en arterias cerebrales de gato, pero no incrementó el flujo basal de radioactividad en las arterias femorales, mientras que el vanadato produjo un aumento de esta secreción en ambos tipos de vasos.
- 9.- La liberación de noradrenalina inducida por ouabaina en arterias cerebrales y femorales fué dependiente de la presencia de calcio extracelular, lo que indica su carácter exocitótico. Por el contrario la evocada por vanadato fué independiente de este ión, hecho que sugiere un mecanismo no exocitótico.
- 10.- La disminución de sodio en el medio extracelular produjo un marcado incremento de la respuesta secretora de la ouabaina en ambos tipos de arterias, pero no modificó la liberación inducida por vanadato. Estos resultados parecen indicar que la secreción originada por la ouabaina está mediada por la inhibición de la bomba de sodio, e implica la participación del sistema de intercambio  $Na^{\dagger}-Ca^{2\dagger}$ , mientras que el vanadato aumenta el flujo de noradrenalina por un mecanismo diferente, no relacionado con la ATPasa.



RESUMEN

En el presente trabajo se han estudiado los efectos de la ouabaina y algunos derivados de vanadio (fármacos inhibidores de la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger}\text{-K}^{\dagger}$  dependiente) sobre el tono contráctil y la liberación de  $\text{H}^3$ -noradrenalina en arterias cerebrales y femorales de gato. Estos fármacos indujeron respuestas vasoconstrictoras en ambos tipos de arterias. En los vasos femorales, la administración de fentolamina o el pretratamiento de los animales con reserpina redujeron la contracción inducida por ouabaina, mientras que el verapamil no la modificó significativamente. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, en las arterias cerebrales se obtuvo el efecto contrario. La vasoconstricción producida por vanadato en ambas arterias no se alteró con ninguno de los tratamientos antes reseñados (reserpina, fentolamina o verapamil). La administración simultánea de ouabaina y vanadato originó una respuesta equivalente a la suma de las observadas con cada agente por separado. La relajación causada por  $\text{K}^{\dagger}$  en ambas arterias, previamente contraídas con noradrenalina en un medio libre de potasio, fué inhibida por ouabaina pero no por vanadato. La liberación de  $\text{H}^3$ -noradrenalina evocada por ouabaina fué marcadamente reducida en Krebs-Hanseleit sin  $\text{Ca}^{2\dagger}$  (exocitótica), y potenciada en un medio con 11.9 mM de  $\text{Na}^{\dagger}$  en ambos tipos de arterias, mientras que la inducida por vanadato no se modificó en estas mismas condiciones (no exocitótica). Todos estos resultados indican lo siguiente: 1/ Sólo en las ar-

terias femorales la respuesta contráctil evocada por ouabaina posee un componente adrenérgico indirecto. 2/ La contracción y la secreción de noradrenalina inducida por ouabaina - está causada por la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^{\dagger}\text{-K}^{\dagger}$  dependiente, mientras que las respuestas producidas por el vanadato no están relacionadas con esta enzima en ninguna de las arterias estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- SKOU, J.C.: The influence of some cation on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* 23:394-401, 1957.
- 2.- HILDEN, S. y HOKIN, L.: Coupled  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  transport in vesicles containing a purified Na, K -ATPase and only phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 69: 521-527, 1976.
- 3.- ANNER, B.M.; LANE, L.K.; SCHARTZ, A. y PITTS, B.J.R.: A reconstituted  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  pump in liposomes containing purified  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  - ATPase from kidney medulla. *Biochim. Biophys. Acta.* 467: 340-345, 1977.
- 4.- SCHWARTZ, A.; LINDENMAYER, G.E. y ALLEN, J.C.: The sodium, potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27: 3-134, 1975.
- 5.- SCHWARTZ, A y ADAMS, R.J.: Studies on the digitalis receptor. *Circ. Res.* 46 (Suppl. I): I154-I160, 1980.
- 6.- WALLICK, E.T.; LANE, L.K. y SCHWARTZ, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41: 397-411, 1979.
- 7.- RHEE, H.M. y HOKIN, L.E.: Inhibition of the purified sodium-potassium activated adenosine-triphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 1139-1145, 1975.

- 8.- DE PONT, J.J.H.H.M.; VAN PRODIJEN-VAN EEDEN, A y BONTING, S.L.: Role of negatively charged phospholipids in highly purified Na, K-ATPase from rabbit kidney outer medulla. *Biochim. Biophys. Acta* 508: 464-477, 1978.
- 9.- AKERA, T. y BRODY, T.M.: The role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol, Rev.* 29: 187-220, 1978.
- 10.- LANGER, A.L.: Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmacol.* 30: 3261-3264, 1981.
- 11.- VIZI, E.S.: Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> activated adenosine triphosphatase as a trigger in transmitter release. *Neuroscience.* 3: 367-384, 1978.
- 12.- GARCIA, A.G. y KIRPEKAR, S.M.: Release of noradrenaline from cat spleen by sodium deprivation. *Br. J. Pharmacol.* 47: 729-747, 1973.
- 13.- CANTLEY, L.C.; JOSEPHSON, L.; WARNER, R.; YANAGISAWA, M.; LECHENE, C. y GUIDOTTI, G.: Vanadate is a potent -- (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421-7423, 1977.
- 14.- WHITHERING, W.: An account of the foxglove and some of its medicinal uses: with practical remarks on dropsy and other diseases. *Med. Class.* 2: 305-443, 1937.
- 15.- GOLD, H. y CATELL, M.: Mechanism of digitalis action in abolishing heart failure. *Arch. Inter. Med.* 65: 263-278, 1940.

- 16.- SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45: 596-617, 1965.
- 17.- REPKE, K.: Influence of cardioactive principles on pump ATPases. En Proceeding of the First International Pharmacological Meeting, vol 3: New aspects of cardiac glycosides. Ed. por Wilbrandt, W. y Lindgren, P.; Oxford, Pergamon Press, pp 127-130, 1963.
- 18.- MATSUI, H. y SCHWARTZ, A.: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the sodium, potassium dependent adenosine triphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 151: 663-665, 1968.
- 19.- ALBERS, R.W.: The (sodium plus potassium) transport - - ATP-ase. En The enzymes of Biological Membranes, vol. 3 Ed. por Martinosi, A. Nueva York, Plenum Press, pp 283-301, 1976.
- 20.- LEE, K.S. y KLAUS, W.: The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol Rev.* 23: 193-261, 1971.
- 21.- THOMAS, R.; BROWN, L.; BOUTAGY, J. y GELBART, A.: The digitalis receptor: inferences from structure-activity relationship studies. *Circ. Res.* 46 (Suppl. I): I167-I172, 1980.
- 22.- YODA, A. y YODA, S.: Structure-activity relationship of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* 11: 653-662, 1975.

- 23.- FRICKLE, V. y KLAUS, W.: Evidence for two different Na - dependent ( $^3\text{H}$ )-ouabain binding sites of an Na, K -ATP-ase of guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* 61: 423-428, 1977.
- 24.- DE POVER, A. y GODFRAIND, T.: Interaction of ouabain with (Na + K) ATPase from human heart and from guinea-pig heart. *Biochem. Pharmacol.* 28: 3051-3056, 1979.
- 25.- WELLSMITH, N. y LINDENMAYER, G.: Two receptor forms for ouabain in sarcolemma-enriched preparations from canine ventricle. *Circ. Res.* 47: 710-720, 1980.
- 26.- CHIPPERFIELD, A.R. y WHITTAM, R.: Ouabain binding to the sodium pump. *Nature*, 242: 62-63, 1973.
- 27.- AKERA, T. y BRODY, T.M.: Membrane adenosine triphosphatase: the effect of potassium on the formation and dissociation of the ouabain-enzyme complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176: 545-557, 1971.
- 28.- LINDENMAYER, G.E. y SCHWARTZ, A.: Nature of the transport ATPase-glycoside complex. IV: Evidence that sodium and potassium competition for a common site modulates the rate of glycoside interaction. *J. Biol. Chem.* 248: 1291-1300, 1973.
- 29.- BAKER, P.F. y WILLIS, J.S.: Binding of the cardiac glycosides ouabain to intact cells. *J. Physiol.* 224: 441-462, 1972.
- 30.- MELDGAARD, L.; STEINESS, E. y WALDORFF, S.: Time course of ouabain uptake in isolated myocardial cells: dependence on extracellular potassium and calcium concentration. *Br. J. Pharmacol.* 73: 341-345, 1981.



- 31.- KU, D.D.; AKERA, T.; TOBIN, T. y BRODY, T.M.: Comparative studies on the effect of monovalent cations and ouabain on cardiac Na, K - ATPase and contractile force. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197: 458-469, 1976.
- 32.- REPKE, K.: Über denbiochemischen Wirkungsmodus von Digitalis. Klin. Wschr. 42: 157-165, 1964.
- 33.- BESH, H.R. y SCHWARTZ, A.: On the mechanism of action of digitalis. J. Mol. Cell. Cardiol. 1: 195-199, 1970.
- 34.- GERVAIS, A.; LANE, L.K.; ANNER, B.M.; LINDENMAYER, G.E. y SCHWARTZ, A.: A possible mechanism of the action of digitalis. Circ. Res. 40: 8-14, 1977.
- 35.- GLITSCH, H.G.; REUTER, H. y SCHOLZ, H.: The effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles. J. Physiol. 209: 25-43, 1970.
- 36.- REUTER, H.: Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Circ. Res. 34: 599-605, 1974.
- 37.- REUTER, H. y SEITZ, N.: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol. 195: 451-470, 1968.
- 38.- BAKER, P.F.; BLAUSTEIN, M.P.; HODKIN, A.L. y STEINHARDT, R.A.: The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J. Physiol. 200: 431-458, 1969.
- 39.- SJODIN, R.A.: Contribution of Na/Ca transport to the resting membrane potential. J. Gen. Physiol. 76: 99-108, 1980.
- 40.- LANGER, G.A.: Sodium-calcium exchange in the heart. Ann. Rev. Physiol. 44: 435-449, 1982.

- 41.- DIPOLO, R. y BEAUGE, L.: The calcium pump and sodium-calcium exchange in squid axons. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 313-324, 1983.
- 42.- BLAUSTEIN, M.P. y OBORN, C.J.: The influence of sodium on calcium fluxes in pinched-off nerve terminals "in vitro". *J. Physiol.* 247: 657-686, 1975.
- 43.- DIPOLO, R. y BEAUGE, L.: Mechanism of calcium transport in the giant axon of the squid and their physiological role. *Cell Calcium.* 1: 147-169, 1980.
- 44.- BAKER, P.F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. En Calcium Movement in excitable cells. Ed. por Baker, P.F. y Reuter, H., Oxford, Pergamon Press. pp 7-53, 1974.
- 45.- BLAUSTEIN, M.P.: Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys. J.* 20: 79-111, 1977.
- 46.- BAKER, P.F. y BLAUSTEIN, M.P.: Sodium-depend uptake of calcium by crab nerve. *Biochim. Biophys. Acta.* 150: 167-170, 1968.
- 47.- BLAUSTEIN, M.P.: The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70: 33-82, 1974.
- 48.- LINDER, J. y BROOKER, G.: Sodium requirement for effects of ouabain on contraction of isolated guinea pig atria. *Circ. Res.* 46: 553-564, 1980.

- 49.- GODFRAIND, T. y GHYSEL-BURTON, J.: Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature*. 265: 165-166, 1977.
- 50.- GHYSEL-BURTON, J. y GODFRAIND, T.: Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardioactive steroids in relation to their binding sites and their inotropic effect on guinea-pig isolated atria. *Br. J. Pharmacol.* 66: 175-184, 1979.
- 51.- GODFRAIND, T. y GHYSEL-BURTON, J.: Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3067-3069, 1980.
- 52.- SEIFEN, E.: Evidence for participation of catecholamines in cardiac action of ouabain. *Europ. J. Pharmacol.* 26: 115-118, 1974.
- 53.- SHARMA, V.K.; POTTICK, L.A. y BANERJEE, S.P.: Ouabain stimulation of noradrenaline transport in guinea pig heart. *Nature*. 286: 817-819, 1980.
- 54.- DOUGLAS, W.W. y RUBIN, R.P.: The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.* 167: 288-310, 1963.
- 55.- KARAKI, H. y URAKAWA, N.: Possible role of endogenous catecholamines on the contraction induced by ouabain and sodium depletion in rabbit aorta. *Europ. J. Pharmacol.* 43: 65-69, 1977.
- 56.- BONACCORSI, A.; HERMSMEYER, K.; SMITH, C.B. y BOHR, B.F.: Norepinephrine release in isolated arteries induced by K-free solution. *Am. J. Physiol.* 232: H140-H145, 1977.

- 57.- KARAKI, H.; OZAKI, H. y URAKAWA, N.: Effects of ouabain and potassium-free solution on the contraction of isolated blood vessels. *Europ. J. Pharmacol.* 48:439-443, -- 1978.
- 58.- VIZI, E.S.; TÖRÖK, T. y MAGYAR, K.: Effect of potassium on the release of <sup>3</sup>H-Noradrenaline from rabbit and human pulmonary artery, *J. Neurochem.* 42:670-676, 1984.
- 59.- KIRPEKAR, S.M.; PRAT, J.C.; y YAMAMOTO, H.: Effects of metabolic inhibitors on norepinephrine release from the perfused spleen of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 172: 342-350, 1970.
- 60.- OZAWA, H. y KATSURAGI, T.: Ouabain-induced potentiation on the contraction of the guinea pig vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 25: 147-152, 1974.
- 61.- NAKAZATO, Y.; OHGA, A. y ONODA, Y.: The effect of ouabain on noradrenaline output from peripheral adrenergic neurones of isolated guinea pig vas deferens. *J. Physiol.* 278: 45-50, 1978.
- 62.- TODA, N.: Mechanisms of ouabain-induced arterial muscle contraction. *Am. J. Physiol.* 239: H199-H205, 1980.
- 63.- BANKS, P.: The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium. *J. Physiol.* 193: 631-637, 1967.
- 64.- GARCIA, A.G.; HERNANDEZ, M.; HORGÁ, J.F. y SANCHEZ-GARCIA, P.: On the release of catecholamines and Dopamine beta-hydroxylase evoked by ouabain in the perfused cat adrenal gland. *Br. J. Pharmacol.* 68: 571-583, 1980.

- 65.- WAKADE, A.R.: Facilitation of secretion of catecholamines from rat and guinea-pig adrenal gland in potassium-free medium or after ouabain. *J. Physiol.* 313: 481-498, 1981.
- 66.- DOUGLAS, W.W.: Stimulus-secretion coupling: the concept and does cromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 451-474, 1968.
- 67.- WEINSHILBOUM, R.; THOA, N.B.; JOHNSON, D.G.; KOPIN, I. J. y AXELROD, J.: Proportional release of norepinephrine and dopamine beta hydroxylase from sympathetic nerves. *Science.* 174: 1349-1351, 1971.
- 68.- KIRPEKAR, S.M. y MISU, Y.: Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence of calcium. *J. Physiol.* 188: 219-234, 1967.
- 69.- VANHOUTTE, P.M.: Adrenergic neuroeffector interaction - in the blood vessel wall. *Federation Proc.* 37: 181-186, 1978.
- 70.- ESQUERRO, E.; GARCIA, A.G.; HERNANDEZ, M.; KIRPEKAR, S. M. y PRAT, J.C.: Catecholamine secretory response to calcium reintroduction in the perfused cat adrenal gland - treated with ouabain. *Biochem. Pharmacol.* 29: 2669-2673, 1980.
- 71.- VIZI, E.S.: Release mechanism of acetylcholine and the role of  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$ , activated ATPase. En Cholinergic mechanism. Ed. por Wager, P.G. Nueva York, Raven Press, pp 199-211, 1975.

- 72.- STICKNEY, J.L.: Relationship between effects of ouabain on accumulation and efflux of noradrenaline in tissue slices. Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 244: 244-254, 1980.
- 73.- LEONARD, E.: Alteration of contractile response of artery strips by a potassium-free solution, cardiac glycosides and change in stimulation frequency. Am. J. Physiol. 189: 185-190, 1957.
- 74.- BRIGGS, A.M. y SHIBATA, S.: Ca and ouabain interaction on vascular smooth muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 274-278, 1966.
- 75.- OZAKI, H.; KARAKI, H. y URAKAWA, N.: Possible role of Na - Ca exchange mechanism in the contractions induced in guinea-pig aorta by potassium-free solution and ouabain. Arch. Pharmacol. 304: 203-209, 1978.
- 76.- OZAKI, H. y URAKAWA, N.: Na - Ca exchange and tension development in guinea-pig aorta. Arch. Pharmacol. 309: 171-178, 1979.
- 77.- WALLICK, E.T.; ADAMS, R.J.; FONDACARO, J.D. y JACOBSON, E.D.: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase of the canine mesenteric artery. Federation Proc. 41: 2101-2105, 1982.
- 78.- PALATY, V.: The transient contractile response of the isolated rat tail artery to inhibition of the sodium pump. Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 336-339, 1980.
- 79.- MIKKELSEN, E.; ANDERSON, K.E. y LEDERBALLE PEDERSEN, O.: Effects of digoxin on isolated human peripheral arteries and veins. Acta Pharmacol. Toxicol. 45: 249-256, 1979.

- 80.- REUTER, H.; BLAUSTEIN, M.P. y HAEUSLER, G.: Na -Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. - Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B265: 87-94, 1973.
- 81.- VAN BREEMEN, C.; FARINAS, B.; CASTEELS, R.; GERBA, P.; WUYTACK, F. y RETH, R.: Factors controlling cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B265: 57-71, 1973.
- 82.- HENDRICKX, H. y CASTEELS, R.: Electrogenic sodium pump in arterial smooth muscle cells. Pflügers Arch. 346: 299-306, 1974.
- 83.- BLAUSTEIN, M.P.: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis. Am. J. Physiol. 232: C165-C173, 1977.
- 84.- FLEMING, W.W.: The electrogenic,  $Na^+$ ,  $K^+$  - pump in smooth muscle: physiologic and pharmacological significance. - Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 129-149, 1980.
- 85.- DETH, R.C. y LYNCH, C.J.: The binding of  $^3H$ -ouabain to  $Na^+$  -  $K^+$  ATPase sites in arterial smooth muscle. Pharmacology. 21: 29-37, 1980.
- 86.- PREISS, R. y BANASCHAK, H.: Demonstration of Mg. ATPase from the arteria carotis communis of the sheep. Acta -- Biol. Med. Ger. 34: 37-44, 1975.
- 87.- WEI, J.W.; JANIS, R.A. y DANIEL, J.H.: Studies on subcellular fraction from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats: alterations in both calcium uptake and enzyme activities. Blood Vessels. 13: 293-308, 1976.

- 88.- HEXUM, T.D.: Characterization of  $\text{Na}^{\dagger} - \text{K}^{\dagger} - \text{ATPase}$  from vascular smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* 12: 393-396, -- 1981.
- 89.- BROCK, T.A.; LEWIS, J.L. y SMITH, J.B.: Angiotensin increases the entry and Na/K pump activity in cultures of smooth muscle from the rat aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 1438-1442, 1982.
- 90.- AVIV, A.; HIGASHINO, H.; HENSTEN, D.; BAUMAN, J.W.; LUBIT, B.W. y SEARLE, B.M.:  $\text{Na}^{\dagger} - \text{K}^{\dagger} - \text{ATPase}$  in rat vascular smooth muscle cell grown in vitro. *Am. J. Physiol.* 244: c227-c233, 1983.
- 91.- ADAMS, R.J.; WALLICK, E.T.; ASANO, E.; DISALVO, J.; FONDACARD, J.D. y JACOBSON, E.D.: Canine mesenteric artery  $\text{Na}^{\dagger} - \text{K}^{\dagger} - \text{ATPase}$ : vasopressor receptor for digitalis? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 468-482, 1983.
- 92.- ANDERSON, D.K.: Cell potential and the sodium-potassium pump in vascular smooth muscle. *Proc. Fed. Am. Exp. Biol.* 35: 1294-1297, 1976.
- 93.- OZAKI, H. y URAKAWA, N.: Involvement of a Na - Ca exchange mechanism in contraction induced by low-Na solution in isolated guinea-pig aorta. *Pflügers Arch.* 390: 107-112, 1981.
- 94.- BROEKAERT, A. y GODFRAIND, T.: The actions of ouabain on isolated arteries. *Arch. Intern. Pharmacodyn.* 203: 393-395, 1973.
- 95.- PALATY, V.: Release of noradrenaline from rat tail artery induced by inhibition of sodium pump in calcium-free solution. 59: 347-350, 1981.



- 96.- NAKAZATO, Y.; ITO, S. y OHGA, A.: Noradrenaline output induced by calcium, strontium and barium during exposure of guinea-pig vas deferens to ouabain, *Europ. J. Pharmacol.* 68: 327-337, 1980.
- 97.- KATSURAGI, T.; USUNE, S. y FURUKAWA, T.: Mechanism of ~~ex~~traneuronal adrenaline release induced by  $K^+$  - free medium and ouabain, but not by high KCl in vas deferens of guinea-pig and rat. *Europ. J. Pharmacol.* 81: 217-225, - 1982.
- 98.- NAKAZATO, Y.; ITO, S. y OHGA, A.: Dual mechanism of ouabain action on noradrenaline output from guinea-pig vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 89: 77-84, 1983.
- 99.- PATON, D.M.: Characteristics of efflux of norepinephrine from adrenergic neurons. En The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines. Ed. por Paton, D.M. Nueva York, Raven Press, pp 155-174, 1976.
- 100.- WATERS, M.D.: Toxicology of vanadium. *Adv. Mod. Toxicol.* 2: 147-189, 1977.
- 101.- SIMMONS, T.J.B.: Vanadate: a new tool for biologists. *Nature.* 281: 337-338, 1979.
- 102.- WERDAN, K.; BAURIEDEL, G.; BOZSIK, M.; KRAWIETZ, W. y ERDMANN, E.: Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells: vanadate transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in beating and in active - cation transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 597: 364-383, 1980.

- 103.- WITKOWSKA, D. y BRZEZINSKI, J.: Effect of metavanadate on the uptake and release of noradrenaline in rat brain cerebral cortex slices. *Toxicol. Let.* 17: 223-231, 1983.
- 104.- SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; ERDMANN, E.; KRAWIETZ, W. y -- WERDAN, K.: Effect of vanadium in the  $+5$ ,  $+4$  and  $+3$  oxidation states on cardiac force of contraction, adenylate cyclase, and  $(Na^+ + K^+) - ATPase$  activity. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3853-3860, 1982.
- 105.- BEAUGE, L.A. y GLYNN, I.M.: Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of  $(Na + K) - ATPase$  to external potassium. *Nature.* 272: 551-552, 1978.
- 106.- BOND, G.H. y HUDGINS, P.M.: Kinetics of inhibition of  $Na, K - ATPase$  by  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  and vanadate. *Biochem.* 18: 325-331, 1979.
- 107.- CANTLEY, L.C.; RESH, M.D. y GUIDOTTI, G.: Vanadate inhibits the red cell  $(Na^+, K^+) ATPase$  from the cytoplasmatic side. *Nature.* 272: 552-554, 1978.
- 108.- MYERS, T.D. y BOERTH, R.C.: Interactions of ouabain and vanadate With  $(Na^+, K^+) ATPase$  and isolated cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 96: 39-46, 1980.
- 109.- AKERA, T.; TAKEDA, K.; YAMAMOTO, S. y BRODY, T.M.: Effects of vanadate on  $Na^+, K^+ - ATPase$  and on the force of contraction in guinea-pig hearts. *Life Sci.* 25: 1803-1812, 1979.
- 110.- DIPOLLO, R.; ROJAS, H.R. y BEAUGE, L.: Vanadate inhibits uncoupled  $Ca$  efflux but not  $Na - Ca$  exchange in squid axons. *Nature.* 281: 228-229, 1979.

- 111.- WIERICHS, R.; HAGENMEYER, A. y BADER, H.: Influence of Ca and Mg on the vanadate inhibition of the Ca - ATPase from pig heart sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92: 1124-1129, 1980.
- 112.- CANTLEY, L.C.; FERGUSON, J.H. y KUSTIN, K.: Norepinephrine complexes and reduces vanadium (V) to reverse vanadate inhibition of the (Na,K)-ATPase, *J. Am. Chem. Soc.* 100: 5210-5212, 1978.
- 113.- HUDGINS, P. y BOND, G.H.: Reversal of vanadate inhibition of Na, K-ATPase by catecholamines. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.* 23: 313-326, 1979.
- 114.- HACKBARTH, I.; SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; ERDMANN, E.; KRAWIETZ, W. y PHILIPP, G.: Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle. *Nature.* 275: 67, 1978.
- 115.- BORCHARD, U.; FOX, A.A.L.; GREEF, K. y SCHLIEPER, P.: Negative and positive inotropic action of vanadate on atrial and ventricular myocardium. *Nature.* 279: 339-341, 1979.
- 116.- GRUPP, G.; GRUPP, C.L.; WALLICK, E.T. y SCHWARTZ, A.: Effects of vanadate on cardiac contraction and adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88: 440-447, 1979.
- 117.- TAKEDA, K.; TEMMA, K. y AKERA, T.: Inotropic effects of vanadate in isolated rat and guinea-pig heart under conditions which modify calcium pools involved in contractile activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 132-139, 1982.

- 118.- TAKEDA, K.; AKERA, T.; YAMAMOTO, S. y SHIEH, I.S.: Possible mechanisms for inotropic actions of vanadate in isolated guinea-pig and rat heart preparation. Arch. Pharmacol. 314: 161-170, 1980.
- 119.- ERDMANN, E.; KRAWIETZ, W.; PHILIPP, G.; HACKBARTH, I.; SCHMITZ, W. y SCHOLZ, H.: Stimulatory effect of vanadate on  $(Na^{\dagger} + K^{\dagger})$  - ATPase activity and on  $^3H$ -ouabain-binding in a cat heart cell membrane preparation. Nature. 278: 459-461, 1979.
- 120.- ERDMANN, E.; KRAWIETZ, W.; PHILIPP, G.; HACKBARTH, I.; SCHMITZ, W. y SCHOLZ, H. y CRANE, F.L.: Purified cardiac cell membranes with high  $(Na^{\dagger} + K^{\dagger})$  ATPase activity contain significant NADH-vanadate reductase activity. Nature. 282: 335-336, 1979.
- 121.- SCHWABE, U.; PUCHSTEIN, C.; HANNEMANN, H. y SOCHTIG, E.: Activation of adenylate cyclase by vanadate. Nature. 277 143-145, 1979.
- 122.- BRUCKNER, R.; SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; SCHUMACHER, A.; ERDMANN, E.; KRAWIETZ, W. y WERDAN, K.: Negative inotropic effect of vanadate in ventricular myocardium in the presence of 3-isobutyl-1-methylxanthine or isoprenaline. Arch. Pharmacol. 315: 147-153, 1980.
- 123.- BALFOUR, W.E.; GRANTHAM, J.J. y GLYNN, I. M.: Vanadate stimulated natriuresis. Nature. 275: 768, 1978.
- 124.- KUMAR, A. y CORDER, C.N.: Diuretic and vasoconstrictor effects of sodium orthovanadate on the isolated perfused rat kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213: 85-90, 1980.

- 125.- HUOT, S.; MULDOON, S.; PANMANI, M.; CLOUGH, D. y HADDY, F.J.: Effects of sodium vanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) on wall tension and  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  pump activity in isolated canine saphenous vein. *Federation Proc.* 38: 1036, 1979.
- 126.- GARCIA, A.G.; JURKIEWICZ, A. y JURKIEWICZ, N.H.: Contractile effect of vanadate and other vanadium compounds on the rat vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 70: 17-23, 1981.
- 127.- FEDAN, J.S.; WESTFALL, D.P. y FLEMING, W.W.: Species differences in sodium potassium adenosine triphosphatase activity in the smooth muscle of the guinea-pig and rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 356-363, -- 1978.
- 128.- UEDA, U.; KISHIMOTO, T.; OZAKI, H. y URAKAWA, N.: Dual actions of vanadate on high  $\text{k}^+$  -induced contraction in guinea-pig taenia coli. *Japan J. Pharmacol.* 32: 149-157, 1982.
- 129.- NAYLER, R.A. y SPARROV, M.P.: Mechanism of vanadate-induced contraction of airways smooth muscle of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 80: 163-172, 1983.
- 130.- HADDY, F.J.: Potassium effects on contraction in arterial smooth muscle mediated by  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *Federation Proc.* 42: 239-245, 1983.
- 131.- REITER, D.: The role of the electrogenic sodium pump in the potassium relaxation of the rabbit ear artery. *Arch. Pharmacol.* 303: 213-220, 1978.
- 132.- CLINTON WEBB, R. y BOHR, D.F.: Potassium induced relaxation as an indicator of  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels.* 15: 198-207, 1978.

- 133.- HERMSMEYER, K.: Sodium pump hyperpolarization-relaxation in rat caudal artery. *Federation Proc.* 42: 246-252, 1983.
- 134.- LOCKETTE, W.E.; CLINTON WEBB, R. y BOHR, D.F.: Prostaglandins and potassium relaxation in vascular smooth muscle of the rat. *Circ. Res.* 46: 714-720, 1980.
- 135.- DE MEY, J. y VANHOUTTE, P.M.: Effect of removal and substitution of potassium ions on the adrenergic and cholinergic reactivity in canine femoral artery. *Europ. J. Pharmacol.* 67: 159-164, 1980.
- 136.- SUZUKI, N.; KASUYA, Y.; KUBOTA, S. y FUKUDA, H.: Replacement of  $K^+$  with  $Rb^+$  or  $Cs^+$  and its effects on the mechanical responses to norepinephrine and methacholine in the rat vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 62: 253-259, 1980.
- 137.- CLINTON WEBB, R.; LOCKETTE, W.E.; VANHOUTTE, P.M. y BOHR, D.F.: Monovalent ion specificity of the electrogenic sodium pump in vascular smooth muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 457-461, 1981.
- 138.- CLINTON WEBB, R. y BOHR, D.F.: Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels.* 16: 71-79, 1979.
- 139.- PAMNANI, M.B.; CLOUGH, D.L.; HUOT, S.J. y HADDY, F.J.: Vascular sodium-potassium pump activity in various models of experimental hypertension. *Clin. Sci.* 59: 1795-1815, 1980.

- 140.- MULVANY, M.J.; NYBORG, N. y NILSSON, H.: Effect of sodium-potassium-dependent ATPase inhibition on noradrenaline-activated calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in adult spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 59: 2035-2055, 1980.
- 141.- BROCK, T.A.; SMITH, J.B. y OVERBECK, H.W.: Relationship of vascular sodium-potassium pump activity to intracellular sodium in hypertensive rats. *Hypertension*. 4 (suppl. II): II43-II48, 1982.
- 142.- CLINTON WEBB, R. y BOHR, D.F.: Vascular reactivity in hypertension: altered effect of ouabain?. *Experientia*. 36: 220-222, 1980.
- 143.- NILSSON, H. y MULVANY, M.J.: Prolonged exposure to ouabain eliminates the greater norepinephrine-dependent calcium sensitivity of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 3: 691-697, 1981.
- 144.- FLIER, J.S.; MARATOS-FLIER, E.; PALLOTTA, J.A. y McISAAC, D.: Endogenous digitalis like activity in the plasma of the toad, *Bufo marinus*. *Nature*. 279: 341-343, 1979.
- 145.- GODFRAIND, T. y CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.: Properties of a digitalis like factor extracted from guinea pig brain. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 250: 316, 1981.
- 146.- AKAGAWA, K.; HARA, N. y TSUKADA, Y.: Partial purification and properties of the inhibitors of Na, K-ATPase and ouabain-binding in bovine central nervous system. *J. Neurochem.* 42: 775-780, 1984.

- 147.- HAMLYN, J.M.; RINGEL, R.; SCHAEFFER, J.; LEVINSON, P.D.; HAMILTON, B.P.; KOWARSKI, A.A. y BLAUSTEIN, M.P.: A circulating inhibitor of  $(Na^{\dagger} + K^{\dagger})$  ATPase associated with essential hypertension. *Nature*. 300: 650-652, 1982.
- 148.- GILBERT, J.C.; SAWAS, A.H. y WYLLIE, M.G.: Stimulation and inhibition of synaptosome ATPase by noradrenaline. The involvement of cytoplasmic factor. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 245: 42-47, 1980.
- 149.- ADAM-VIZI, V.; ORDOGH, M.; HORVATH, I.; SOMOGY, J. y VIZI, E.S.: Effect of noradrenaline and vanadium on  $Na^{\dagger} - K^{\dagger}$  activated ATPase in rat cerebral cortex synaptosomal preparation. *J. Neural. Trans.* 47: 53-60, 1980.
- 150.- PHILLIS, J.W. y WU, P.H.: Failure of vanadate contamination in ATP to account for noradrenaline stimulation of Na, K - ATPase in rat brain homogenates. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 556-558, 1979.
- 151.- LARSEN, J.A. y THOMSEN, O. Ø.: Vanadate induced oliguria and vasoconstriction in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 110: 367-374, 1980.
- 152.- JADHAV, A.L. y JANDHYALA, B.S.: Effects of chronic administration of vanadate on blood pressure, heart rate and  $Na^{\dagger}/K^{\dagger}$  - ATPase activity in adult male Wistar rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 263: 74-84, 1983.
- 153.- MARIN, J. y RIVILLA, F.: Nerve endings and pharmacological receptors in cerebral vessels. *Gen. Pharmacol.* 13: 361-368, 1982.



- 154.- NIELSEN, K.C. y DWMAN, C.: Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 27: 33-42, 1971.
- 155.- BRAY, G.A.: A simple liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. -- *Analyt. Biochem.* 1: 279-285, 1960.
- 156.- SNEDECOR, G.M. y COHRAN, W.G.: Statistical methods, 6ª edición. Iowa. The Iowa State University Press, 1967.
- 157.- TODA, N.; HAYASHI, S. y HATTORI, R.K.: Analysis of the effect of tyramine and norepinephrine in isolated canine cerebral and mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 382-391, 1977.
- 158.- SALAICES, M.; MARIN, J.; MARCO, E.J.; CONDE, M.V.; GOMEZ, B. y LLUCH, S.: Neurogenic vasoconstriction of cat cerebral and femoral arteries. *Gen. Pharmacol.* 14: 355-360, 1983.
- 159.- SEARLE, B.M.; HIGASHINO, H.; KHALIL, F.; BOGDEN, J.D.; TOKUSHIGE, A.; TAMURA, H.; KIND, M. y AVIV, A.: Vanadate effect on the Na, K-ATPase and Na-K pump in In vitro grown rat vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 53: 186-191, 1983.
- 160.- FOX, A.A.L.; BORCHARD, U. y NEUMANN, M.: Effects of vanadate on isolated vascular tissue: biochemical and functional investigations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 309-316. 1983.
- 161.- OZAKI, H. y URAKAWA, N.: Effects of vanadate on mechanical responses and Ka-K pump in vascular smooth muscle. *Europ. J. Pharmacol.* 68: 339-347, 1980.

- 162.- BUKOSKI, R.D.; SEIDEL, C.L. y ALLEN, J.C.: Ouabain binding,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ , ATPase activity, and  $^{86}\text{Rb}$  uptake of canine arteries. *Am. J. Physiol.* 245: H604-H609, 1983.
- 163.- MARIN, J.; SALAICES, M. y SANCHEZ, C.F.: Analysis of the effects of noradrenaline and tyramine in isolated middle cerebral and femoral arteries of cat. *Gen. Pharmacol.* 13: 125-132, 1982.
- 164.- MARIN, J. y SANCHEZ, C.F.: Release of noradrenaline from cat cerebral arteries by different drugs and potassium. *Biochem. Pharmacol.* 29: 840-842, 1980.
- 165.- MARIN, J. y SANCHEZ, C.R.: Influence of calcium on noradrenaline release evoked by 5-hydroxytryptamine, tyramine and potassium from goat pial arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 643-646, 1980.