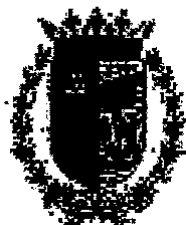


M
TESIS
2284



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

Esclarecimiento del mecanismo de acción de la dotarizina como agente antimigrañoso

TESIS DOCTORAL

ANA RUIZ NUÑO

R. F. M. 20849

Directores:

Luis Gandía Juan

Antonio García García

Manuela García López



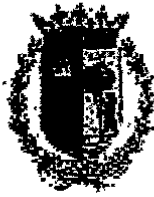
Madrid, Julio 2001

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Desali enli

Madrid, 25 Julio 2001

"em laude" por
mantenida el

The image shows four handwritten signatures in black ink, arranged in two rows and two columns. The signatures are highly stylized and cursive. The top-left signature is the most complex, with many loops and flourishes. The top-right signature is more compact and angular. The bottom-left signature is a long, sweeping horizontal stroke with a large loop at the end. The bottom-right signature is a shorter, more compact cursive signature.



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

D. LUIS GANDÍA JUAN, Profesor Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

D^a MANUELA GARCÍA LÓPEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

D. ANTONIO GARCÍA GARCÍA, Catedrático del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

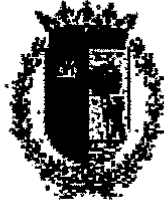
CERTIFICAN, que Doña ANA RUIZ NUÑO ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: "Esclarecimiento del mecanismo de acción de la dotarizina como agente antimigrañoso", como Tesis para alcanzar el grado de Doctor en Medicina.

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 11 de junio de 2001.

Dr. Luis Gandía Juan
Prof. Titular de Farmacología

Dra. Manuela García López
Prof. Titular de Farmacología

Dr. Antonio García García
Catedrático de Farmacología

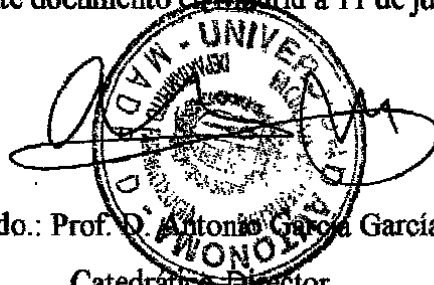


Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

D. ANTONIO GARCÍA GARCÍA, Catedrático y Director del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACE CONSTAR: Que no existe inconveniente alguno para que la Tesis titulada *"Esclarecimiento del mecanismo de acción de la dotarizina como agente antimigrañoso"* realizada por ANA RUIZ NUÑO sea presentada y defendida para optar al Título de Doctor.

Para que conste firmo el presente documento en Madrid a 11 de junio de 2001.



Fdo.: Prof. D. Antonio García García
Catedrático-Director

A mis padres y hermanas

A Manuel

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Prof. Antonio García García por su confianza en mí, su apoyo y formación continua. Por facilitarme todos los medios necesarios para la realización de esta tesis doctoral e irradiarme de todo su entusiasmo científico.

Agradezco al Prof. Luis Gandía por sus enseñanzas, sus consejos, sus ideas brillantes y por hacer que la realización de esta tesis se haya llevado a cabo.

A la Profa. Manuela García López su confianza y enseñanzas, y por brindarme la oportunidad de empezar con unas prácticas en su laboratorio y realizar los experimentos de la primera parte de esta tesis.

Agradezco al Prof. Pedro Sánchez García por su amable acogida en el Departamento, por transmitirme su sabiduría, buen humor y optimismo.

A la Profa. Mercedes Villarroya por su más sincera amistad, colaboración y disponibilidad en todo.

A la Profa. Elspeth MacLachlan por su amistad, acogida y enseñanzas en su Laboratorio y a todos los compañeros que hicieron tan agradable mi estancia allí.

A mi compañera de laboratorio María por su ayuda y amistad al comienzo de esta tesis.

A Ana Briones por enseñarme a montar los microvasos..

A Carlos, Ester, Inma, Antonio Jesús, por todos los buenos momentos compartidos con ellos.

A mis compañeros de laboratorio Viqui, Jesús, Inés y Jonny, por aguantarme y ayudarme en la segunda etapa de mi tesis.

A mis compañeros de la Princesa, Jesús y Sonia

A todo el resto de compañeros del Departamento, Almudena, Carmen, Francisco, Eva, Ricardo, Román, Arancha, Nati, Pili, Javier,...

A los nuevos becarios, Marcos, Eva, Carmen, Jorge, Gloria, Luisa, Esperanza, Cristóbal y a todos aquellos que hayan ido o venido de este Departamento

A todos mis amigos por estar siempre ahí en los momentos difíciles, en especial a mi amiga Patricia, compañera de batallas.

A Manuel, por su comprensión, paciencia y ayuda constante en todos los momentos arduos de mi tesis.

Y aunque sean los últimos no por ello menos importantes, a mis padres y mis hermanas, por toda su generosidad, confianza y apoyo.

ABREVIATURAS

Ag II	Angiotensina II
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
[Ca ²⁺] _e	Concentración extracelular de Ca ²⁺
CCVD	Canales de calcio voltaje-dependientes
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CI ₅₀	Concentración inhibidora 50
cNOS	Oxido nítrico sintasa constitutiva
c.p.m.	cuentas por millón
DHPs	Dihidropiridinas
DMEM	Medio de Dulbecco modificado por Eagle
e.e.m.	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético
GTP	Trifosfato de guanina
HEPES	(N-[2-hidroxiethyl]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico])
[³ H]-NA	Noradrenalina tritiada
5-HT	5-Hidroxitriptamina, serotonina
I _{Ba}	Corriente de Bario
IHS	Comité de la Sociedad Internacional de Cefalea ("International Headache Society")
I/V	Intensidad-voltaje
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil ester
NA	Noradrenalina
NKA	Neurokinina A
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
SP	Sustancia P
TEA	Tetraetilamonio
TTX	Tetrodotoxina
V _{1/2}	Voltaje medio de inactivación
V _m	Potencial de membrana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.-<u>LA MIGRAÑA</u>	2
1.1.-CLASIFICACIÓN DE LA MIGRAÑA	3
1.1.1.-La migraña común	4
1.1.2.-La migraña clásica	4
1.2.-FASES DE LA MIGRAÑA	5
1.2.1.-Fase de pródromo	5
1.2.2.-Fase de aura	5
1.2.3.-Fase de cefalea	6
1.2.4.-Fase posdrómica.....	7
2.-<u>ETIOPATOGENIA DE LA MIGRAÑA</u>	7
2.1.-TEORÍA VASCULAR	8
2.2.-TEORÍA NEUROVASCULAR O NEUROGÉNICA	8
2.3.-ANOMALIAS SEROTONINÉRGICAS	12
2.4.-LA HIPÓTESIS DEL NO	13
2.5.-LA MIGRAÑA COMO UNA CANALOPATÍA	13
2.5.1.-Diversidad farmacológica de los canales de Ca ²⁺	14
2.5.2.-Diversidad molecular de los canales de Ca ²⁺	16
2.5.3.-Canales de calcio voltaje-dependientes de subtipo P/Q.....	18
3.-<u>TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA</u>	19
3.1.-MEDIDAS HIGIÉNICO-DIETÉTICAS	19
3.2.-TRATAMIENTO PREVENTIVO	20
3.3.-TRATAMIENTO DE LA CRISIS MIGRAÑOSA	22
4.-<u>LA DOTARIZINA</u>	24
OBJETIVOS	28

MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.-ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	32
1.1.-BAÑO DE ORGANOS	32
1.2.-MIÓGRAFO DE MULVANY	34
<i>Normalización de las arterias de resistencia</i>	35
1.3.-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	36
1.3.1.-Contracción inducida por serotonina	36
1.3.2.-Contracción inducida por otros agentes vasoconstrictores	37
1.3.2.-Contracción inducida por estimulación eléctrica transmural	38
2.-CULTIVOS CELULARES.....	39
2.1.- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS .	39
<i>La célula cromafin como modelo de paraneurona</i>	40
2.2.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NEURONAS SIMPÁTICAS	41
3.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS (“PATCH-CLAMP”).....	41
3.1.-CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ADHERIDA O PARCHE “IN SITU” (“CELL-ATTACHED”)	42
3.2.-CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ENTERA.....	43
<i>Registro y análisis de las corriente de Ca²⁺</i>	44
3.3.-CONFIGURACIÓN DE PARCHE PERFORADO	45
3.4.-CONFIGURACIONES DE PARCHE ESCINDIDO	45
4.-ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES.....	46
4.1.-LIBERACIÓN DE NORADRENALINA TRITIADA	46
4.2.-MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES.....	47
RESULTADOS	49
1.-ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	50
1.1.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR SEROTONINA EN DISTINTOS LECHOS VASCULARES	50
1.2.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR OTROS AGENTES VASOCONSTRICTORES	54

1.3.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA.....	57
1.4.-ANTAGONISMO DE LOS RECEPTORES DE 5-HT	58
1.5.-VOLTAJE-DEPENDENCIA DEL EFECTO BLOQUEANTE DE DOTARIZINA	60
1.6.-DEPENDENCIA DEL Ca ²⁺ DEL EFECTO BLOQUEANTE DE LA DOTARIZINA	64
2.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	66
2.1.-DISECCIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES DE CALCIO DEL SUBTIPO P/Q.....	66
2.2.-CINÉTICA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q	69
2.3.-CONCENTRACIÓN-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q	70
2.4.-USO-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q	71
2.5.-VOLTAJE-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q	73
2.6.-EFECTOS DE DOTARIZINA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES P/Q	75
3.-ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES.....	76
3.1.-SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS.....	77
3.2.-LIBERACIÓN DE NORADRENALINA TRITIADA EN NEURONAS SIMPÁTICAS.....	79
DISCUSIÓN	81
1.-ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	82
1.1.-EFECTO ANTISEROTONINÉRGICO DE LA DOTARIZINA	82
1.2.-EFECTO CALCIO-ANTAGONISTA DE LA DOTARIZINA	83
1.3.-BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES	84

2.-ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	86
2.1.-CARACTERÍSTICAS DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q	86
2.2.-CANALES P/Q Y LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES	88
3.-PAPEL DE LA DOTARIZINA EN EL TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA.....	88
 CONCLUSIONES	90
 BIBLIOGRAFÍA	92

INTRODUCCIÓN

1.-LA MIGRAÑA

La migraña es un proceso muy común y con grandes repercusiones tanto personales como sociales. Se estima que afecta a más del 10% de la población, siendo unas tres veces más frecuente en mujeres (un 65% de los casos aparecen asociados a la menstruación) que en hombres, produciendo una incapacitación para realizar su trabajo. Es la segunda patología crónica en la infancia atendiendo a su frecuencia.

La cefalea es el síntoma neurológico más frecuente y el principal motivo neurológico de consulta médica, calculándose que hasta el 80% de la población padece cefalea de forma más o menos habitual. En función de su origen, las cefaleas pueden clasificarse en primarias y secundarias, siendo las primeras más frecuentes durante las primeras décadas de la vida, mientras que a partir de la cuarta década aumenta la incidencia de las cefaleas secundarias a diversas causas orgánicas.

Las **cefaleas primarias** son las más frecuentes y el dolor de cabeza constituye en sí el desorden o alteración principal, sin que puedan detectarse lesiones orgánicas subyacentes. Dentro de éstas se incluyen la cefalea tensional, la migraña, la cefalea en racimos y otras cefaleas no asociadas a la lesión estructural (cefalea punzante idiopática, cefalea por presión externa, cefalea producida por estímulos fríos, cefalea tusígena benigna, cefalea producida por el ejercicio benigna y cefalea coital).

Por el contrario, en las **cefaleas secundarias**, la cefalea es sólo un síntoma, expresión secundaria de procesos intracraneales no vasculares (tumores, quistes en aracnoides, anomalías del líquido cefalorraquídeo, infecciones); lesiones vasculares de cabeza o cuello (aneurismas y malformaciones vasculares, hemorragias parenquimatosas, subdurales o epidurales, isquemia cerebral, oclusión o disección de arterias carótidas o vertebrales, arteritis); enfermedades de ojos, oídos, nariz, boca o estructuras del cuello; o alteraciones sistémicas (fiebre); metabólicas (hipoxia, hipoglucemia, acidosis) o intoxicaciones (exposición a monóxido de carbono).

En la presente Tesis Doctoral nos vamos a centrar en la migraña o jaqueca, una patología que afecta al 12-15% de la población adulta, si bien podemos considerar que esta cifra no refleja la incidencia real, ya que en muchas ocasiones, bien por presentarse de forma

muy esporádica o bien por problemas culturales, las personas que la padecen no acuden al médico, quedando por tanto infravalorada. Entre las características epidemiológicas de los casos diagnosticados, cabe destacar que aproximadamente un tercio de los pacientes presentan dos o más crisis migrañosas por mes, es una patología claramente predominante en mujeres (60% de los casos), y aparece especialmente entre los 25 y los 55 años y, con elevada frecuencia, interfiere en la calidad de vida y desencadena reacciones depresivas.

1.1.-CLASIFICACIÓN DE LA MIGRAÑA

La “migraña”, es un término extensamente difundido a lo largo de la Historia. Galeno (130-200 d. de C.) destaca la naturaleza unilateral de los ataques e introduce el término griego de *hemikranios*, que es traducido por los romanos al latín como *hemicranium*, para corromperse después a *hemigranea* y de ahí a *migranea*. El nombre actual de *migraña* deriva de la traducción del equivalente francés *migraine* que ganó adeptos en el ámbito médico en el transcurso del siglo XVIII.

La migraña se caracteriza clínicamente por un dolor intenso, generalmente de carácter pulsátil, que afecta a uno o ambos lados de la cabeza y se acompaña de otras molestias como malestar de estómago o perturbaciones de la visión. A la hora de tipificar la migraña va a resultar de gran importancia determinar el número de episodios por año y distinguir sobre la intensidad del dolor entre leve (no altera las actividades diarias), moderado (dificulta los quehaceres cotidianos) y el severo (impide las actividades de la vida diaria). Es importante resaltar, además, que en un mismo paciente puede coexistir más de un tipo de cefalea e, incluso, variar el patrón de la cefalea en el curso del tiempo, precisando su reevaluación y ajuste terapéutico. No todos los episodios de cefalea en un individuo se pueden clasificar, manifestando a veces episodios atípicos, bien por no recordar con exactitud los síntomas (ocurre sobre todo en los primeros ataques) o por otros motivos.

Para la clasificación de las migrañas se siguen actualmente las directrices establecidas en 1988 por el Comité de la IHS. Esta entidad clasifica los distintos subtipos de migraña en función de su cuadro clínico y la presencia o no de organicidad general y neurológica. De acuerdo a estos criterios de la IHS se distinguen principalmente dos tipos de migraña con características bien definidas: la migraña común y la migraña clásica (tabla 1).

Tabla 1.-Subtipos clínicos de migraña definidos por la IHS

- Migraña sin aura (migraña común):** no hay síntomas visuales o sensoriales. Se presenta con cefalea, náusea, vómitos, fotofobia.

- Migraña con aura (migraña clásica):** con síntomas visuales o sensoriales (aura) que preceden a la cefalea. Dentro de ésta se distinguen:
 - **Migraña con aura típica:** se desarrolla y dura de 5 a 60 minutos.
 - **Migraña con aura prolongada:** dura entre 60 minutos y una semana.
 - **Migraña hemipléjica familiar:** dolor de cabeza prolongado, de horas a días, seguido de hemiparesia de recuperación lenta al cabo de los días.
 - **Migraña vertebro-basilar o de Bickerstaff:** focalidad del tronco del encéfalo en forma de coma, diplopía o parestesias periorales. También síntomas como acúfenos, vértigos, desorientación, ataxia y disartria.
 - **Equivalente migrañoso:** aura sin cefalea posterior
 - **Migraña con aura de comienzo agudo:** el aura se desarrolla en menos de 5 minutos, imitando un accidente cerebrovascular agudo.

- Migraña oftalmopléjica:** debilidad de los músculos oculomotores (menos de un 1%)

- Migraña retiniana:** presentan un aura consistente en anaurosis unilateral (menos de un 1%)

1.1.1.-La migraña común

La migraña común, o migraña sin aura, se caracteriza porque el paciente presenta un flujo sanguíneo cerebral normal y no presenta otros síntomas neurológicos. El dolor de cabeza se asocia con náuseas y, aunque no sea precedido por el aura, se puede observar una fase previa a la aparición de la cefalea, que puede durar hasta 24 horas y en la que el paciente puede presentar, entre otros síntomas, cambios de apetito, humor, fatiga y retención de líquidos. Una vez que aparece el dolor de cabeza, éste suele ir acompañado de otra sintomatología entre la que destacan las náuseas, vómitos, fotofobia, hiperacusia, poliuria y/o diarrea. El ataque de migraña puede durar desde horas a días y es seguido de prolongados intervalos sin dolor. La frecuencia de aparición de este tipo de migraña varía desde 1-2 episodios al año hasta 1-4 episodios al mes.

1.1.2.-La migraña clásica

La migraña clásica o “con aura” se caracteriza porque el paciente presenta cambios en el flujo regional cerebral. Unos 10-30 minutos antes de la aparición de la crisis migrañosa, el paciente puede presentar una serie de síntomas que en su conjunto se denominan **aura**. Éste es un fenómeno neurológico, en el que además de alteraciones visuales (el paciente puede ver como destellos de luz o líneas en zig-zag, o perder temporalmente la visión) pueden

producirse cambios sensoriales y motores (dificultad para comunicarse, debilidad de los brazos o piernas, hormigueo de la cara o las manos, y confusión). Este aura puede aparecer incluso sin estar asociado a la posterior cefalea.

El dolor de la migraña clásica se describe como intenso y punzante, afectando preferentemente a la frente, la sien, el oído, la mandíbula o alrededor del ojo. Habitualmente el dolor suele empezar en un lado de la cabeza, pudiendo extenderse hacia el otro lado. La duración de la crisis suele ser de 1 a 2 días. Dentro de ésta hay distintos subtipos clínicos de migraña resumidos en la tabla 1.

1.2.-FASES DE LA MIGRAÑA

En el desarrollo de una crisis migrañosa se pueden llegar a distinguir varias fases, si bien debemos resaltar que no todas ellas van a aparecer en todos los pacientes. Por orden cronológico, el paciente puede presentar las siguientes fases (figura 1):

1.2.1.-Fase de pródromo

Puede ocurrir desde horas a días antes de la aparición de la crisis migrañosa, siendo una especie de advertencia sobre la inminente aparición de ésta. Se caracteriza por la posible aparición de una amplia variedad de síntomas neurológicos (euforia, depresión, fonofobia, fotofobia, rigidez de cuello, desinhibición, hiperactividad, irritabilidad y disfunción cognitiva), autonómicos (bostezos, diaforesis, diarrea, estreñimiento, sed, retención de fluidos, sensación de frío, poliuria) o sistémicos (fatiga, anorexia, ansia de alimentos).

Por la naturaleza de estos síntomas anticipatorios se piensa que está implicada la activación de estructuras corticales, límbicas e hipotalámicas.

1.2.2.-Fase de aura

El aura es un conjunto de síntomas neurológicos focales, de carácter transitorio, que se instaura lentamente durante un período de 5 a 20 minutos, dura menos de 60 minutos y suele preceder a la cefalea (aunque en ocasiones el aura puede aparecer simultáneamente con la cefalea, aparecer con posterioridad a la misma o incluso presentarse sin cefalea asociada).

Las alteraciones neurológicas que constituyen el aura son en la mayoría de los casos visuales en forma de escotomas centelleantes (comúnmente comienzan como un arco de luz blanca o coloreada que se va extendiendo, pudiendo tener patrón en zig-zag) y en caso de disfunción de la retina como destellos de luz (fotopsias). Los defectos del campo visual aumentan de tamaño lentamente y pueden llegar a producir ceguera completa transitoria. Con frecuencia los pacientes describen los síntomas visuales en términos vagos, tales como visión borrosa, doble visión u oscilaciones. También pueden ocurrir alteraciones sensoriales como parestesias, en forma de adormecimiento u hormigueo, afectando generalmente a la cara y manos. Las parestesias pueden durar desde unos segundos a 20-30 minutos y se propagan más lentamente de lo que se observa en las crisis epilépticas sensoriales y en los síntomas sensoriales isquémicos.

El aura sensorial, generalmente, se resuelve en el curso de unos minutos, produciéndose usualmente un período de latencia hasta el comienzo de las cefaleas, aunque en algunos sujetos se superponen temporalmente.

Las auras motoras son raras en la migraña, pudiendo manifestarse como debilidad de las extremidades o de los músculos faciales de un lado del cuerpo, sin hiperreflexia. Muchos pacientes describen una sensación de pesadez en las extremidades de un lado del cuerpo antes de la cefalea, pero el examen neurológico durante esta fase no desvela la existencia de ninguna paresia.

El aura también puede aparecer en forma de alteración transitoria del lenguaje (disfasia) tanto de tipo expresivo como receptivo. Se caracterizan por la dificultad en la articulación o en la formación/compresión del lenguaje. Los distintos tipos de aura descritos se asocian con leve grado de confusión y dificultad de concentración.

1.2.3.-Fase de cefalea

Aparece un dolor de cabeza de intensidad moderado-severo, en un lado de la cabeza (unilateral) y de carácter punzante, generalmente acompañado por náuseas, vómitos, sensibilidad a la luz y al sonido, fatiga y depresión. Suele durar entre 4 horas a 3 días desde la instauración del dolor, y con una alta frecuencia se entra en una fase de sueño profundo una vez que acaba la cefalea.

1.2.4.-Fase posdrómica

Es la fase de “resaca”, cuando el sujeto muestra estar fatigado. Puede tener irritabilidad, dificultad de concentración, pérdida de apetito. Por el contrario, puede sentirse revitalizado y con grandes energías.

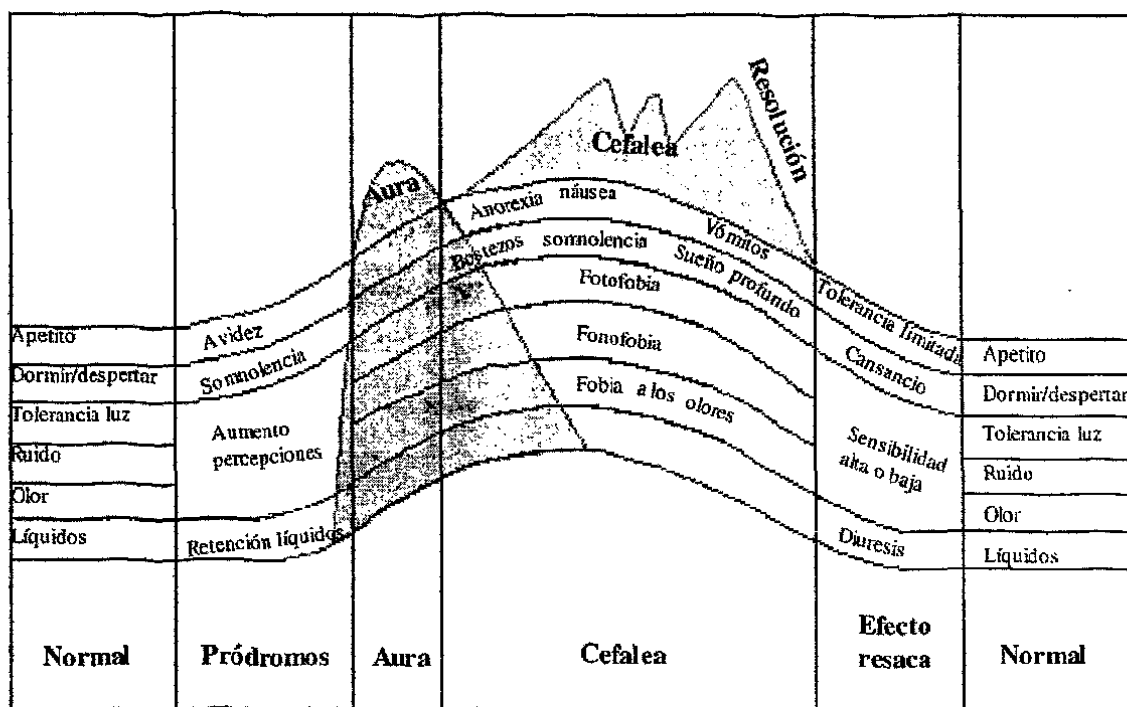


Figura 1.-Signos y síntomas de una ataque completo de migraña

2.-ETIOPATOGENIA DE LA MIGRAÑA

La patogenia de la migraña es, todavía hoy, un misterio. En la aparición de la sintomatología propia de las diversas fases de la migraña se implican componentes vasculares y neurogénicos, pero no sabemos bien qué es primero y cuál es la función que estos componentes desempeñan en el aura o en el cuadro agudo (fotofobia, fonofobia, cefalea

pulsátil, vómitos y náuseas). Entre las diversas teorías etiopatogénicas que se han postulado podemos destacar las siguientes.

2.1.-TEORÍA VASCULAR

Esta fue la primera teoría etiopatogénica sobre la migraña, postulada por Wolf, entre 1940 y 1950. Postulaba la existencia de una vasoconstricción a nivel de vasos cerebrales durante la fase de pródromo de la migraña y una vasodilatación durante la fase de cefalalgia (Wolf, 1987).

Los postulados de esta teoría se corroboran cuando al administrar agentes vasoconstrictores, como los agonistas de los receptores de serotonina 5-HT_{1B/1D} (los triptanes) o los alcaloides del cornezuelo de centeno (ergotamina y dihidroergotamina), se produce un alivio del dolor migrañoso agudo, mientras que al administrar agentes vasodilatadores como los β -bloqueantes (propranolol, atenolol, metoprolol) o calcio-antagonistas (flunarizina y su análogo en desarrollo clínico, dotarizina, motivo de esta Tesis Doctoral), éstos actúan previniendo la aparición de la crisis. Además hay diversos estudios en los que se ha constatado una disminución del flujo sanguíneo cerebral durante la fase de aura y un incremento del mismo durante la fase de dolor agudo de la migraña (Lance, 1981).

Esta hipótesis es difícil de sustentar por varias razones: por un lado, la disminución del flujo sanguíneo cerebral observada no parece ser suficiente para explicar los síntomas neurológicos focales. Por otro lado, el aumento de flujo sanguíneo cerebral, no explicaría el dolor producido en la migraña ya que este aumento, por sí solo, no es doloroso. Estos cambios de flujo tampoco explican la aparición del edema local, ni la hipersensibilidad focal, que se observan a menudo en los pacientes migrañosos. Por tanto, se cree poco probable que simplemente la vasoconstricción y la vasodilatación sean las bases fisiopatológicas de la enfermedad, aunque está claro que durante los ataques de migraña se produce una alteración del flujo sanguíneo cerebral.

2.2.-TEORÍA NEUROVASCULAR O NEUROGÉNICA

Recientemente se ha postulado otra teoría que integra factores vasculares y neurogénicos y en la que el dolor migrañoso se explica por la activación del sistema trigeminal.

Este sistema constituye una unidad anatómica y funcional en la que participan los vasos sanguíneos, el nervio del trigémino y los núcleos del tronco encefálico en estrecha conexión con el tálamo y el córtex sensitivo (figura 2). El V par craneal participa en la función reguladora del flujo sanguíneo craneal, siendo además una vía clave, para la conducción y posterior modulación del dolor en la cabeza. Las neuronas de las fibras nerviosas sensoriales del trigémino se localizan en el ganglio del trigémino y dan lugar a procesos aferentes que se proyectan periféricamente en la rama superior del nervio trigémino (el nervio oftálmico) que inerva los vasos sanguíneos intracraneales, o se proyectan centralmente al núcleo caudado del nervio del trigémino en la médula oblongata. Por otro lado, en el tallo del encéfalo las fibras eferentes trigeminales activan las neuronas del centro nociceptivo sensorial que se proyectan a los núcleos autónomos y de ahí a centros subcorticales y corticales del dolor. La activación de las vías eferentes autonómicas lleva a los trastornos eméticos y gastrointestinales.

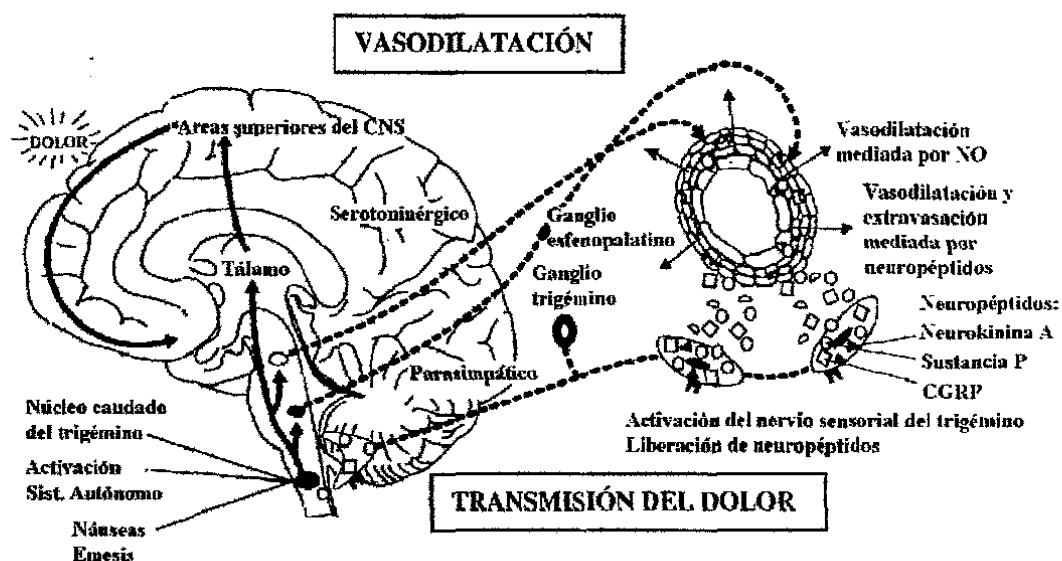


Figura 2.-Hipótesis neurogénica sobre la etiopatogenia de la migraña

Se piensa que, durante el ataque migrañoso, los vasos sanguíneos extracerebrales de tejidos como la duramadre (ej. arteria meníngea media y sus ramificaciones en la duramadre), sufren una vasodilatación y con ello se activan las terminaciones sensoriales nociceptivas que lo inervan (Figura 3)(Humphrey y col., 1991; Martins y col., 1993; Lance, 1993; Williamson, y col., 1996). Paralelamente, la vasodilatación desencadena la inflamación neurogénica local y

estéril por mediación de neuropéptidos vasoactivos como NKA, SP y CGRP (Uddman y Edvinsson, 1989) que son liberados desde las terminaciones sensoriales perivasculares (Goadsby y col, 1990).

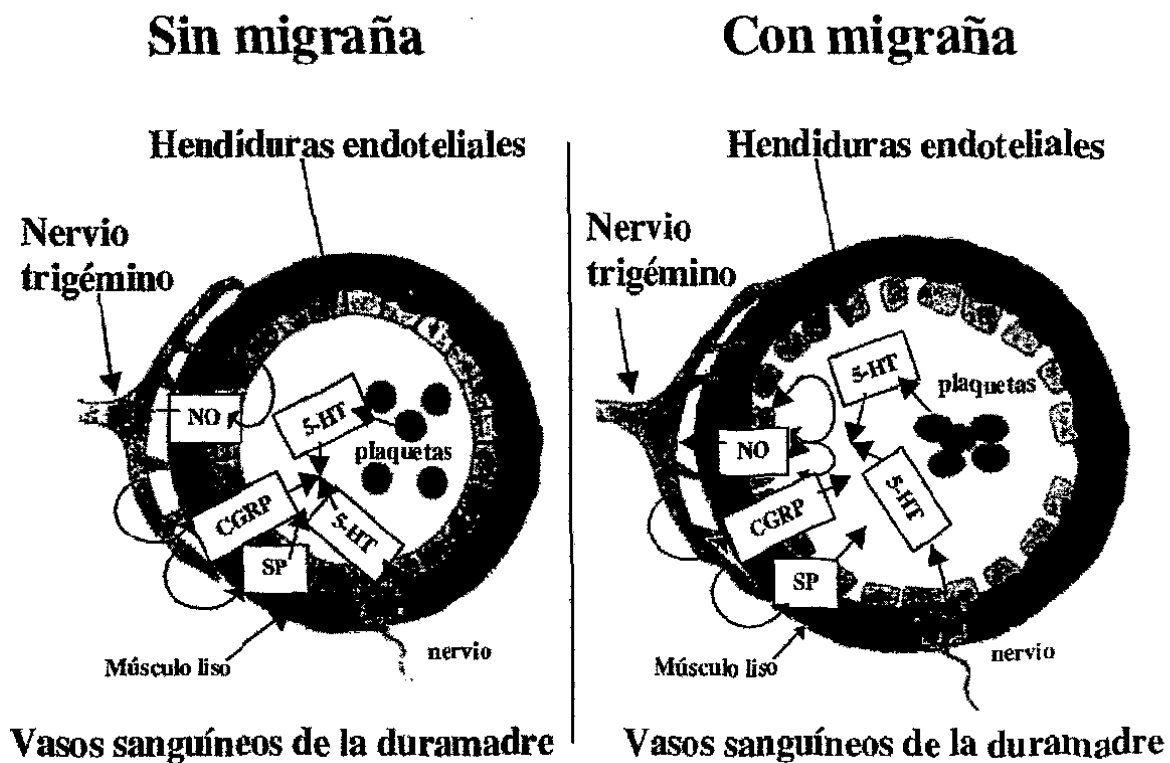


Figura 3.-Esquema representativo de un lecho vascular de la duramadre y la terminación nerviosa aferente del trigémino durante un período sin migraña y cuando se produce el ataque migrañoso. Durante la migraña, los niveles de 5-HT aumentan posiblemente de la liberación procedente de plaquetas o de terminaciones nerviosas próximas. Este aumento provoca la liberación de óxido nítrico presumiblemente de células endoteliales o también de terminaciones nerviosas nitrérgicas. El NO estimula la liberación de SP y del CGRP. La liberación de estos neuropéptidos desencadena la respuesta inflamatoria neurogénica con extravasación de proteínas plasmáticas a través de las células endoteliales y la dilatación de los lechos cerebrales de la duramadre llevando al dolor migrañoso.

Mientras que para estos autores la liberación de neuropéptidos es secundaria a la vasodilatación, Moskowitz argumenta lo contrario (Moskowitz, 1992; Moskowitz, 1993; Moskowitz y Macfarlane, 1993). Describe que la despolarización de las fibras trigeminovasculares desencadena respuestas neuronales asociadas con la transmisión de la información nociceptiva, enviando la información al núcleo caudado del trigémino (Davis y Dostrovky, 1986). La despolarización y la conducción del impulso en sentido antidrómico provoca la liberación de neuropéptidos de las terminaciones trigeminales perivasculares de los

vasos extracraneales. Estos neuropéptidos son los que median la inflamación neurogénica provocando una respuesta vasodilatadora, con extravasación de proteínas plasmáticas y activación del endotelio del vaso.

Entre los neuropéptidos liberados, las taquikininas (NKA y SP) inducen una vasodilatación dependiente de endotelio y aumentan la permeabilidad a través de los receptores situados en el endotelio vascular. El CGRP induce vasodilatación al estimular los receptores de las células del músculo liso vascular. Éste presenta un potente efecto vasodilatador. Se ha visto que su efecto es significativamente más potente que el de la SP (McCulloch y col., 1986), con la que se encuentra colocalizada en las terminaciones trigeminales (Lee y col., 1985). Se piensa que participa en la respuesta refleja o local ante una excesiva vasoconstricción cerebral, restaurando así el diámetro vascular. Aunque el CGRP es un potente agente vasodilatador, no parece intervenir en la extravasación plasmática en la duramadre u otros tejidos extracraneales inervados por el trigémino, al contrario que la SP (Markowitz y col., 1987). Se ha observado también, que tanto el CGRP como la SP, estimulan la liberación de histamina de los mastocitos de la duramadre, lo que los involucraría de nuevo en la vasorregulación craneal y en la inflamación neurogénica local (Ottosson y Edvinsson, 1997).

La liberación de los neuropéptidos activa células endoteliales, mastocitos y plaquetas con el consiguiente aumento de aminas, metabolitos del ácido araquidónico, péptidos e iones. La activación de estas células y de los tejidos dañados provocan una hiperalgesia y un dolor prolongado (Moskowitz, 1993).

Esta inflamación neurogénica es de gran relevancia en el tratamiento de la migraña en su fase aguda. Así, se ha visto que la ergotamina y el sumatriptán bloquean la extravasación de la albúmina- I^{125} a la duramadre, así como la activación de mastocitos y células endoteliales (Saito y col., 1988; Buzzi y Moskowitz, 1990). Hay otros fármacos como los analgésicos opiáceos (Saito y col., 1988) o el valproato (Lee y col., 1995) que también bloquean la extravasación de proteínas plasmáticas.

Finalmente, dentro de esta "teoría neurovascular" queda por determinar si la vasoconstricción es seguida de la vasodilatación, o si la inflamación neurogénica, es el evento central en la patología de la migraña

2.3.-ANOMALIAS SEROTONINÉRGICAS

Diversos estudios han relacionado a la 5-HT, una amina neurotransmisora, con la patogenia de la migraña. Así, se han observado anomalías en el metabolismo de la serotonina en pacientes migrañosos, como una disminución de los niveles plasmáticos de serotonina en los períodos entre crisis migrañosas y un aumento de sus niveles plasmáticos y plaquetarios durante las crisis (Ferrari y Saxena, 1993). Al contrario a lo que se creía anteriormente, parece que el incremento de serotonina durante la fase aguda de la crisis migrañosa no es la causa de la migraña, pero probablemente represente un mecanismo de autodefensa. Se ha observado también, que fármacos como la fenfluramina y la reserpina pueden desencadenar la aparición de una crisis de migraña, al favorecer la liberación de serotonina desde distintos tejidos (Raskin, 1981). Por otro lado, distintos trabajos demuestran cómo la estimulación selectiva de los receptores de serotonina del subtipo 5-HT₁ podrían aliviar las crisis migrañosas.

También se piensa en un posible papel de los receptores de serotonina de los subtipos 5-HT_{2C} ó 5-HT_{2B} en la iniciación de la crisis migrañosa (Fozard y Kalman, 1994). Esta hipótesis se basa en el hecho de que la mCPP (meta-clorofenil-piperazina), un agonista de los receptores 5-HT_{2C}, es capaz de desencadenar una crisis migrañosa tanto en pacientes sanos como en pacientes afectados de migraña. Apoyando esta teoría está el hecho de que la eficacia clínica de algunos fármacos utilizados para el tratamiento preventivo de la migraña (metisergida, pizotifeno, Org GC 94, ciproheptadina, mianserina, amitriptilina, clorpromazina y propanolol) se encuentran en estrecha relación con su potencia como antagonistas de los receptores de serotonina del subtipo 5-HT_{2C}, mientras que otros fármacos como la ketanserina y el pindolol, que muestran muy baja afinidad por estos receptores, resultan poco eficaces como agentes antimigrañosos. Más recientemente, se ha sugerido que los receptores 5-HT_{2B} están más directamente relacionados con la etiopatogenia de la migraña que los 5-HT_{2C} (Schmuck y col., 1996).

Sobre el posible mecanismo de acción de la serotonina como inductor de la crisis migrañosa, se hipotetiza que la serotonina liberada desde las plaquetas o desde las terminaciones nerviosas perivasculares podría actuar sobre los receptores 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} e inducir así la liberación de NO desde las células endoteliales o desde terminaciones nerviosas nitrérgicas. Esta liberación de NO, activa y sensibiliza las neuronas trigéminovasculares,

iniciándose de esta manera el proceso de inflamación neurogénica asociado con la migraña (Olesen y col., 1994), al que nos hemos referido anteriormente (figura 3).

2.4.-LA HIPÓTESIS DEL NO

Desde que se descubrió la inervación nitrérgica intra y extracraneal, se hipotetizó que el NO de los nervios perivasculares y el endotelio participaban en la cefalea de la migraña. Esta hipótesis pudo corroborarse en diversos estudios desarrollados con nitroglicerina, un donador del NO, en los que la administración de este fármaco provocaba la aparición de un ataque migrañoso. En estos estudios los pacientes migrañosos presentaron cefaleas más intensas en comparación con voluntarios sanos (Iversen y col., 1989; Olesen y col., 1995; Thomsen y col., 1993).

Paralelamente, en estudios desarrollados en animales y en humanos, se ha observado que la administración de histamina induce la aparición de cefalea. La histamina produce vasodilatación de las arterias cerebrales al interactuar con los receptores de histamina del subtipo H_1 a nivel del endotelio, activando la eNOS y favoreciendo la consiguiente formación de NO (Krabbe y Olesen, 1980).

Esta hipótesis abre nuevas perspectivas en la terapéutica de la migraña, como la administración de posibles agentes inhibidores de la NOS o de la cascada de reacciones intracelulares que llevan a la síntesis de NO (Olesen y col., 1995; Thomsen y Olesen, 2001) o la administración de agentes antihistamínicos del subtipo H_1 . Por el momento, existen algunos datos controvertidos al respecto, habiéndose observado que la administración de mepiramina, un antihistamínico del subtipo H_1 , abole la cefalea y retrasa la aparición de nuevas crisis migrañosas (Lassen y col, 1995).

2.5.-LA MIGRAÑA COMO UNA CANALOPATÍA

Se definen como “canalopatías” a aquellas entidades patológicas caracterizadas por la existencia de alteraciones en los canales iónicos. Así, se ha descrito que es posible que la excesiva respuesta del cerebro migrañoso que ocurre en algunos pacientes con migraña, como ocurre en la migraña hemipléjica familiar, pueda ser consecuencia de anomalías genéticas en

los canales iónicos que regulan la actividad neuronal, lo que de algún modo permitiría incluir a la migraña en el grupo de las canalopatías.

De hecho, tanto la migraña hemipléjica familiar como la ataxia cerebelosa tipo 2, se han asociado a una alteración de los CCVD del subtipo P/Q, que controlan la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis cerebrales. Estas alteraciones se han encontrado en la subunidad α_{1A} de dichos canales y, además, se han observado mutaciones del gen CACNA1A, conocido por CACNL1A4 (Ophoff y col., 1996). Se ha descrito igualmente que determinadas anomalías en el cromosoma 19 (19p13) (Joutel y col., 1993), están asociadas a la migraña con o sin aura, si bien este gen posee una implicación más clara en la migraña con aura hereditaria (Ophoff y col., 1997). Finalmente, también se han descrito ciertas anomalías en el cromosoma 1 (1q21-q23; 1q31) y cabe esperar, por lo menos, una tercera mutación, dado que hay familias de pacientes migrañosos que no presentan estas anomalías.

Aunque no está claro cómo las mutaciones en CACNA1A conducen a la aparición de los síntomas clínicos. Los genes mutantes probablemente producen proteínas no funcionales con una ganancia o pérdida de función, habiéndose observado tanto un incremento como una disminución de la entrada de calcio, si bien en todos los casos estas mutaciones se asocian con la aparición de episodios de migraña hemipléjica familiar.

Para tratar de explicar la posible implicación de los canales iónicos, y más concretamente de los CCVD en la etiopatogenia del proceso migrañoso, revisaremos a continuación las principales características de estas estructuras:

2.5.1.-Diversidad farmacológica de los canales de Ca^{2+}

Las primeras clasificaciones realizadas (Carbone y Lux, 1984; Nowycky y col., 1985; Fox y col., 1987a,b) distinguieron dos grandes subgrupos en función del rango de voltaje en el que se produce su activación (tabla 2). Así, se denominan canales de Ca^{2+} de bajo umbral de activación (LVA) a aquellos que se activan por voltajes por encima de -50 mV. Son canales que se pueden abrir en respuesta a pequeñas despolarizaciones desde potenciales de membrana bastante negativos. Por otro lado, se consideran como canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación (HVA) a aquellos cuya activación se produce por voltajes superiores (-30 a -20 mV).

Si bien inicialmente las características electrofisiológicas, como la conductancia unitaria del canal y las cinéticas de activación e inactivación, constituyeron los principales argumentos para la clasificación de los diferentes subtipos de CCVD. en los últimos años el empleo de toxinas y fármacos específicos ha determinado la identificación y caracterización de los diversos subtipos de canales de Ca^{2+} . Hasta el momento, existen cuatro subtipos claramente identificados y denominados L, N, P/Q, R (Aosaki y Kasai, 1989; Plummer y col., 1989; Mintz y col., 1992a; Randall y col., 1993; Wheeler y col., 1994; Randall y Tsien, 1995). En general, los canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación se caracterizan por su activación por mayores despolarizaciones, por encima de -20 mV (Tsien y col., 1991), su mayor permeabilidad al Ba^{2+} que al Ca^{2+} y su mayor sensibilidad al bloqueo por Cd^{2+} que por Ni^{2+} . Las variaciones en sus cinéticas de activación e inactivación, así como su diferente farmacología, constituyen las bases para la identificación y caracterización de los diferentes subtipos de canales (tabla 2).

Tabla 2.-Clasificación de canales de calcio voltaje-dependientes

CANALES DE BAJO UMBRAL DE ACTIVACIÓN (LVA)				
<u>Tipo de Canal</u>	<u>Voltaje de activación</u>	<u>Conductancia</u>	<u>Cinética de inactivación</u>	<u>Farmacología</u>
T	> -60 mV	6-9 pS	$\tau = 5-10$ ms Voltaje-dependiente	Ni^{2+} Amilorida
CANALES DE ALTO UMBRAL DE ACTIVACIÓN (HVA)				
<u>Tipo de Canal</u>	<u>Voltaje de activación</u>	<u>Conductancia</u>	<u>Cinética de inactivación</u>	<u>Farmacología</u>
L	> -50 mV	18-28 pS	$\tau > 200$ ms Calcio-dependiente	Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} DPHs
N	> -50 mV	7-14 pS	$\tau = 50$ ms Calcio-dependiente	Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} ω -conotoxina GV1A ω -conotoxina MV1IC ω -conotoxina MV1ID
P	> -45 mV	9, 14, 19 pS	$\tau = 1$ s	Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} FTX: sFTX ω -agatoxina IVA (<20 nM) ω -conotoxina MV1IC
Q	-----	-----	-----	ω -conotoxina MV1IC ω -conotoxina MV1ID ω -agatoxina IVA (>200 nM)
R	-----	-----	-----	SNX-482



2.5.2.-Diversidad molecular de los canales de Ca^{2+}

Fue el grupo de William Catterall, en 1984, el que realizó la primera purificación de un CCVD, en concreto el canal L de músculo esquelético, utilizando membranas del túbulo T. Se demostró que este CCVD era un complejo proteico heteromérico, formado por la combinación de varias subunidades; que recibieron la denominación de α_1 , α_2/δ , β y γ (figura 4). Posteriormente pudo observarse que la subunidad α_1 (170-240 kDa) era la proteína principal del complejo proteico, ya que contiene el poro iónico a través del cual permea el ion Ca^{2+} , así como los sitios de unión para los diferentes fármacos agonistas y antagonistas conocidos. El resto de subunidades que forman el canal (α_2/δ , β y γ) son subunidades auxiliares y/o reguladoras de la actividad del canal (Curtis y Catterall, 1984; Snutch y Reiner, 1992; Dunlap y col., 1995; Gainer y Chin, 1998; Chin, 1998).

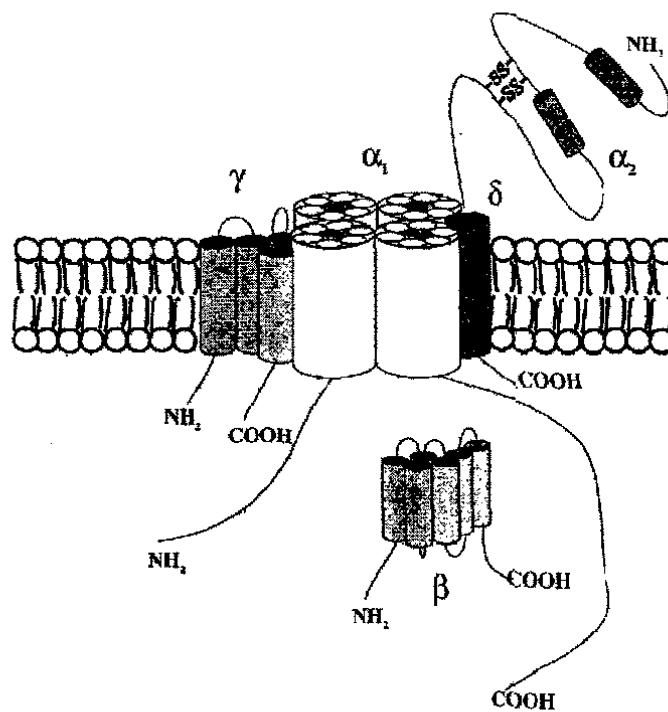


Figura 4.-Estructura molecular de un canal de calcio voltaje-dependiente

La gran explosión en el conocimiento de la estructura molecular de los CCVD vino de la mano del grupo de Numa y colaboradores, que fueron los primeros en secuenciar el cDNA de la subunidad α_1 de músculo esquelético (Tanabe y col, 1987). A raíz de este trabajo se amplió el estudio sobre la estructura molecular de los diferentes subtipos de CCVD y así, hasta la fecha se han identificado diez genes distintos que codifican otras tantas subunidades α_1 , las cuales se corresponden con algunos de los subtipos de CCVD funcionales descritos en neuronas (ver tabla 3) (Birbaumer y col., 1994; Hofmann y col., 1994; Catterall, 1998; Chin, 1998; Fletcher y col., 1998; Randall, 1998).

Tabla 3.-Nomenclatura, lugares de expresión y subunidades que componen los canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación.

Subunidad	Tipo de canal	Nomenclatura	Lugares de expresión
α_{1A}	P/Q	CACNA1A	SNC, placa motora, riñón, células PC12
α_{1B}	N	CACNA1B	SNC, placa motora, neuronas periféricas, células PC12, células neuroendocrinas
α_{1C}	L	CACNA1C	corazón, SNC, músculo liso, fibroblastos, células PC12
α_{1D}	L	CACNA1D	SNC, células neuroendocrinas
α_{1E}	R	CACNA1E	SNC, placa motora
α_{1G}	T	CACNA1G	SNC, corazón
α_{1H}	T	CACNA1H	corazón, hígado, riñón, SNC
α_{1I}	T	CACNA1I	SNC
α_{1S}	L	CACNA1S	músculo esquelético, SNC
β_1		CACNB1	músculo esquelético, SNC
β_2		CACNB2	corazón, SNC, pulmón
β_3		CACNB3	SNC, músculo liso, ovario
β_4		CACNB4	SNC, células neuroendocrinas
$\alpha_{\delta-1}$		CACNA2D1	músculo esquelético, SNC, corazón
$\alpha_{\delta-2}$		CACNA2D2	corazón, páncreas, músculo esquelético, SNC
$\alpha_{\delta-3}$		CACNA2D3	SNC
γ_1		CACNG1	músculo esquelético
γ_2		CACNG2	SNC
γ_3		CACNG3	SNC
γ_4		CACNG4	SNC
γ_5		CACNG5	músculo esquelético, riñón, pulmón, hígado, corazón

2.5.3.-Canales de calcio voltaje-dependientes de subtipo P/Q

Dentro de la subfamilia de CCVD de alto umbral se encuentra el canal codificado por la subunidad α_{1A} . La subunidad α_{1A} se expresa ampliamente en el cerebro de mamíferos, particularmente en neuronas de Purkinje, neuronas granulares de cerebelo y en células piramidales de la región CA3 del hipocampo; también se expresa en la unión neuromuscular, riñón y células PC12 (Mori y col., 1991; Starr y col., 1991; Birnbaumer y col., 1994).

La expresión heteróloga de esta subunidad α_{1A} producía corrientes de Ca^{2+} insensibles a DHPs (bloqueantes selectivos de los canales L) y ω -conotoxina GVIA (bloqueante selectivo de los canales N). Este perfil farmacológico era similar al encontrado dos años antes para los canales P nativos de neuronas de Purkinje (Llinás y col., 1989). Por ello, se pensó que la subunidad α_{1A} de cerebro representaba la subunidad que codificaba para el canal del subtipo P. Sin embargo, cuando la subunidad α_{1A} se expresaba en ovocitos de *Xenopus laevis*, la corriente obtenida difería farmacológica y electrofisiológicamente de la corriente P nativa de las neuronas de Purkinje (Llinás y col., 1989; Mintz y col., 1992a; 1992b). Así, esta nueva corriente expresada en ovocitos sufría una mayor inactivación que la corriente P y además, requería una concentración mayor de ω -agatoxina IVA (a bajas concentraciones bloquea los canales P y a altas concentraciones los Q) para su bloqueo; por ello se pensó que esta corriente correspondía a un nuevo subtipo de canal de Ca^{2+} , al que se denominó canal Q.

Actualmente se piensa que ambas corrientes, P y Q, están codificadas por distintas isoformas de una misma subunidad, la α_{1A} (Mori y col., 1991; Sutton y col., 1998; Bourinet y col., 1999); dependiendo de cómo estas isoformas se combinen con subunidades auxiliares β , se produciría una corriente de tipo P o de tipo Q (Bourinet y col., 1999). Reforzando esta hipótesis, se han publicado recientemente resultados que muestran cómo, tras la ablación del gen que codifica la expresión de la subunidad α_{1A} , se abolen tanto las corrientes P en las neuronas de Purkinje, como las corrientes Q en las neuronas granulares de cerebelo en ratones transgénicos (Jun y col., 1999).

Las corrientes de calcio a través de los canales del subtipo P están presentes ampliamente en neuronas de mamífero y están implicadas en la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis (Hillman y col., 1991; Mintz y col., 1992a,b; Usowicz y col., 1992; Takahashi y Momiyama, 1993; Wheeler y col., 1995). Al igual que el P, las corrientes a través del canal Q, parecen estar implicadas en la liberación de neurotransmisores

(Wheeler y col., 1994; Wheeler y col., 1995). En base a los argumentos citados anteriormente, en esta Tesis hablaremos de canal P/Q en vez de P o Q.

3.-TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA

A la hora de considerar las posibilidades terapéuticas de las que disponemos ante un paciente que sufre de migraña, debemos considerar tres aspectos diferentes: en primer lugar hablaremos de aquellos factores higiénico-dietéticos que nos pueden ayudar a prevenir la aparición de los ataques migrañosos; en segundo lugar comentaremos algunos aspectos sobre los principales fármacos actualmente disponibles con utilidad como tratamiento preventivo de la migraña; finalmente comentaremos algunos aspectos de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la crisis migrañosa aguda.

3.1.-MEDIDAS HIGIÉNICO-DIETÉTICAS

Hoy día se sabe que muchos alimentos pueden ser desencadenantes de la aparición de una crisis migrañosa (tabla 4), en especial aquellos alimentos con potencial efecto vasodilatador, como los que contienen histamina, tiramina o relacionados con la serotonina. La intolerancia a estos alimentos puede basarse en la deficiencia o ausencia de la enzima diaminooxidasa que, normalmente, actúa como filtro a nivel del intestino delgado. Esta enzima se inhibe por el alcohol y aumenta en el embarazo, lo que puede explicar las cefaleas desencadenadas por las bebidas alcohólicas y la mejoría de la migraña durante el embarazo.

Otro aspecto a considerar es el climático-ambiental, ya que existen muchos pacientes migrañosos que no soportan la sensación de agobio cálido y, a veces, húmedo de las aglomeraciones de los grandes almacenes o similares, no se encuentran a gusto en climas cálidos-húmedos y prefieren los fríos y secos, por lo que será recomendable evitar este tipo de ambientes que pueden contribuir al desencadenamiento de una crisis migrañosa.

Finalmente, otro factor desencadenante muy frecuente en nuestros días es la estimulación sensorial prolongada, generalmente de tipo visual, siendo clásica la cefalea que aparece tras la visión de una película larga en un ambiente cerrado, o bien, las frecuentes y actuales quejas de cefalea tras un trabajo prolongado con las pantallas de ordenadores.

Tabla 4.-Alimentos potencialmente desencadenantes de crisis migrañosas	
Bebidas	-Más de dos tazas de café o de té al día -Chocolate líquido o cacao -Bebidas alcohólicas.
Carne, pescado, pollo	- Alimentos curados, conservados o en salazón - Hígado de pollo, carne de caza - Salchichas, chorizo, salchichón, salami, picantes
Productos lácteos	-Mantequilla, "petit-suisse" -Chocolate con leche -Quesos fuertes (camembert, gouda, azul, parma, mozzarella, emmental, brie, cheddar), salsas de queso
Cereales y patatas	-Pastas y bizcochos caseros horneados con levadura -Donuts, sobre todo con chocolate o nueces. -Pizza, pasta italiana con queso, lasaña
Vegetales	-Habas, lentejas, judías blancas y pintas, garbanzos -Cebolla (como condimento) -Aceitunas, frutos secos -Cacahuete, mantequilla de cacahuete -Salsa de soja, levaduras.
Frutas	-Pomelo, aguacate, plátano (se permite medio al día), higos, uvas, papaya, ciruelas rojas, pasionaria
Sopas	- Precocinados (cubitos, sobres, etc.)
Otros	- Salsas chinas, salsas con mucho queso

3.2.-TRATAMIENTO PREVENTIVO DE LA CRISIS MIGRAÑOSA

Cuando los ataques agudos de migraña son frecuentes (más de un episodio semanal) debe pensarse en la profilaxis, ya que la calidad de vida de un paciente migrañoso está notablemente mermada con las crisis repetidas. También será conveniente la aplicación de un tratamiento profiláctico en aquellos pacientes que presenten ataques severos que limiten mucho su actividad diaria ordinaria, en aquellos en que los tratamientos sintomáticos sean ineficaces o les ocasionen efectos adversos intolerables, o en aquellos que presentan crisis de migraña con auras incapacitantes, por ejemplo, las motoras.

Existen diferentes estrategias de prevención a utilizar en los pacientes migrañosos. Así, podemos hablar de una prevención **episódica**, **subaguda** o **crónica**. La prevención **episódica** debe emplearse en aquellos sujetos en los que se puede reconocer un factor desencadenante o precipitante claro, como el ejercicio o la actividad sexual. En este caso se puede adiestrar al paciente en el tratamiento puntual previo a la exposición. En los pacientes que presenten crisis relacionadas con la altitud, menstruación, etc., se puede tratar de forma **subaguda**, aconsejando medicarse antes y durante la exposición. Finalmente, la profilaxis **crónica**, la

más frecuentemente utilizada, se recomienda de forma continua con la intención de disminuir la frecuencia de los ataques.

En la tabla 5 se recogen aquellos fármacos que han demostrado eficacia clínica como preventivos de la aparición de crisis migrañosa:

Tabla 5.-Fármacos utilizados en el tratamiento preventivo de las crisis migrañosas		
Antiepilépticos	<ul style="list-style-type: none"> - Carbamacepina - Valproato sódico - Gabapentina - Topiramato 	
Antidepresivos	Antidepresivos tricíclicos <ul style="list-style-type: none"> - Amitriptilina - Nortriptilina - Protriptilina - Doxepina - Imipramina Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina <ul style="list-style-type: none"> - Fluoxetina - Paroxetina - Sertralina Inhibidores de la Monoamino-oxidasa <ul style="list-style-type: none"> - Fenelcina Otros antidepresivos <ul style="list-style-type: none"> - Isocarboxacida - Burpropión - Mirtazapina - Trazodona - Venlafaxina 	
β-bloqueantes	<ul style="list-style-type: none"> - Atenolol - Metoprolol - Nadolol - Propranolol - Timolol 	
Ca²⁺-antagonistas	<ul style="list-style-type: none"> - Diltiazem - Nimodipino - Verapamilo - Flunarizina - Dotarizina (en fase de desarrollo) 	
AINEs	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirina - Fenoprofeno - Flurbiprofeno - Acido mefenámico - Ibuprofeno - Ketoprofeno - Naproxeno/ naproxeno sódico 	
Antiserotoninérgicos	<ul style="list-style-type: none"> - Ciproheptadina - Metisergida 	
Otros	<ul style="list-style-type: none"> - Magnesio - Vitamina B2 	

3.3.-TRATAMIENTO DE LA CRISIS MIGRAÑOSA AGUDA

Los fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de las crisis migrañosas se recogen en la tabla 6. Por lo general, la terapéutica común en el ataque agudo de migraña implica el uso de analgésicos y AINEs junto con fármacos antieméticos y procinéticos como la metoclopramida. En casos de migrañas severas, se consideran los derivados ergóticos como la ergotamina y la dihidroergotamina, pero esta terapia generalmente se asocia con náuseas y vómitos, además puede presentar adicción, tolerancia y cefalea de rebote, induciendo a seguir tomando el fármaco hasta provocar una intoxicación crónica (ergotismo).

Tabla 6.-Fármacos empleados actualmente en el tratamiento de las crisis migrañosas	
Agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1B/1D}	- Sumatriptán - Rizatriptán - Naratriptán - Zolmitriptán - Almotriptán - Frovatriptán - Eletriptán
Alcaloides ergóticos y derivados	- Ergotamina - Ergotamina+cafeína - Dihidroergotamina
Antieméticos	- Clorpromazina - Metoclopramida - Proclorperazina
AINES	- Acetaminofeno - Ketorolaco - Aspirina - Diclofenaco - Flurbiprofeno - Ibuprofeno - Naproxeno - Naproxeno sódico
Combinación de analgésicos	-Acetaminofeno, cafeína, aspirina
Analgésicos opiáceos	- Butorfanol - Meperidina - Metadona
Otras medicaciones	- Isometepteno - Lidocafna - Dexametasona - Hidrocortisona

En los últimos años, el descubrimiento de los triptanes (sumatriptán, rizatriptán, zolmitriptán, eletriptán, naratriptán y frovatriptán) ha supuesto un claro paso adelante en el

tratamiento sintomático de las crisis. Todos ellos han demostrado ser muy eficaces y se piensa que su eficacia se debe a tres mecanismos diferentes (figura 5), a saber:

- 1) Vasoconstricción de los vasos meníngeos, durales, cerebrales o piales, mediada a través de la activación de los receptores postsinápticos 5-HT_{1B}.
- 2) Inhibición de la inflamación neurogénica, mediante la activación presináptica de los receptores 5-HT_{1D} de las fibras trigeminales tipo A, inhibiendo la liberación de CGRP y con ello la vasodilatación dural; y de las fibras trigeminales tipo C, inhibiendo la liberación de SP y de NKA, bloqueando así la extravasación de proteínas plasmáticas a la duramadre.
- 3) Inhibición de la transmisión de dolor desde el núcleo caudado del trigémino hasta las áreas corticales superiores por actuar sobre los receptores 5-HT_{1D} de las terminaciones trigeminales del tronco del encéfalo.

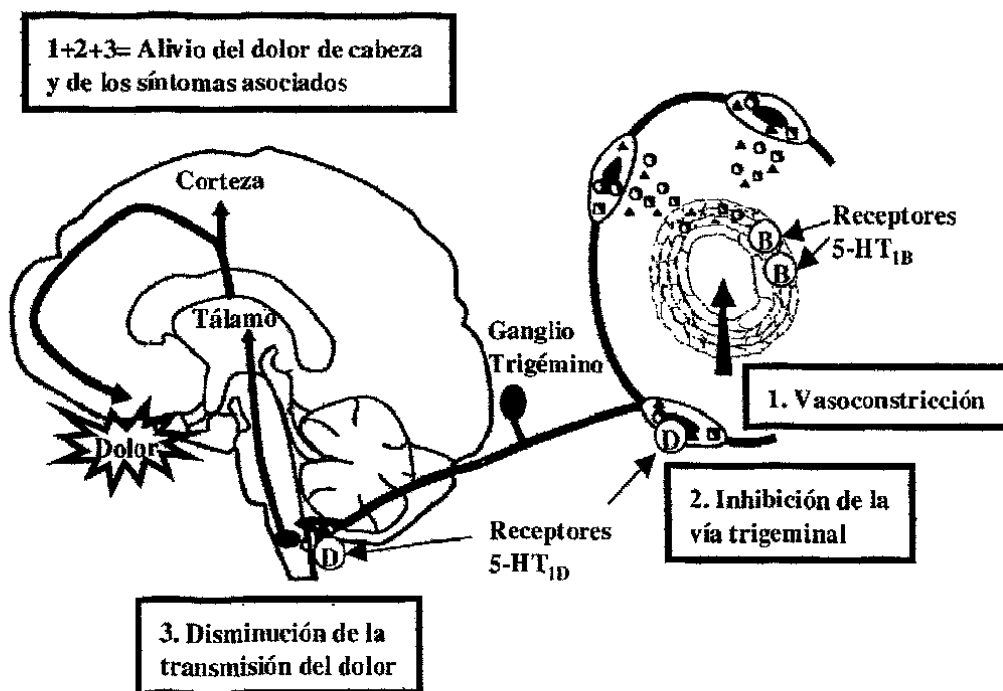


Figura 5.-Mecanismo de acción de los triptanes frente a la crisis migrañosa

4.-LA DOTARIZINA

La dotarizina, (1-(difenilmetil)-4-[3-(2-fenil-1,3-dioxolan-2-il)propil-piperazina), es un nuevo derivado piperazínico relacionado estructuralmente con la flunarizina (figura 6); (Gubert y col., 1987) que está siendo evaluada en diversos ensayos clínicos por sus efectos profilácticos en la migraña y el vértigo (Galiano y col., 1993; Perelló y col., 1998).

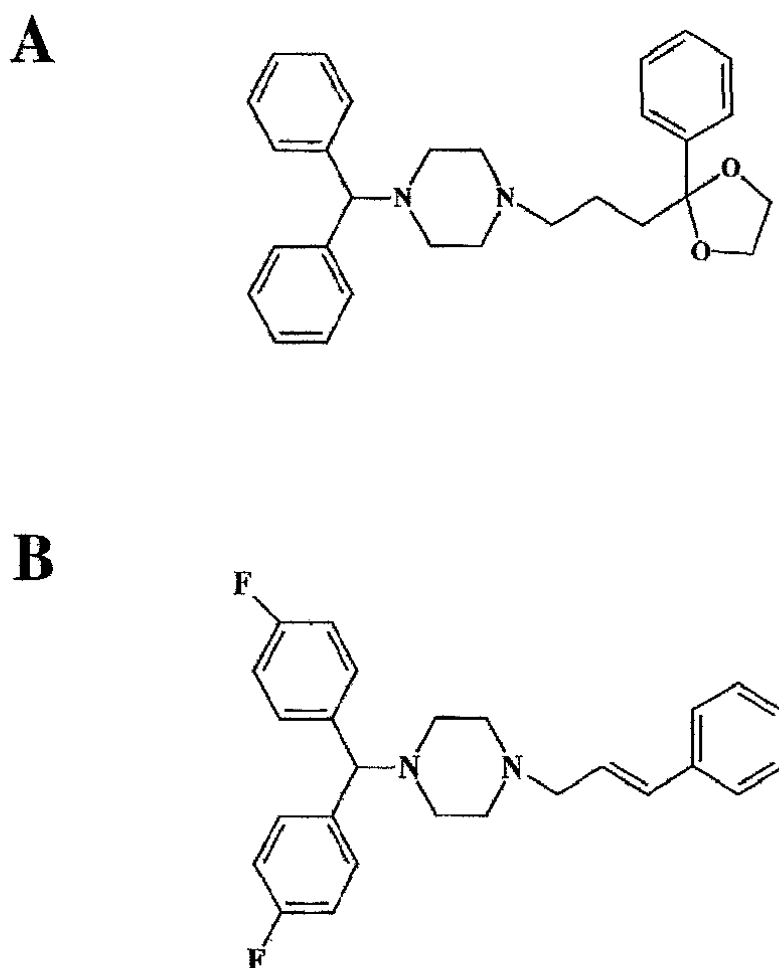


Figura 6.-Estructura química de la dotarizina (panel A) y la flunarizina (panel B)

En estudios preclínicos *“in vitro”* se ha observado que la dotarizina se une a receptores 5-HT₂ de corteza cerebral (Agut y col., 1990) y selectivamente sobre receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} en membranas de cerebro de ratas con una mayor potencia que la cinarizina (Brasó y

col., 1994). También se ha estudiado el efecto de la dotarizina sobre receptores de serotonina expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. En estos estudios, la dotarizina muestra un efecto más potente sobre los receptores 5-HT_{2A} (CI₅₀=2,2 nM) que sobre los 5-HT_{2C} (CI₅₀=1 a 10 µM) (Montiel y col., 1997). Los efectos de la dotarizina sobre el comportamiento en ratas sugieren un efecto inhibitorio de sinapsis serotoninérgicas, en especial a través de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ y 5-HT₃. La dotarizina (50 mg/Kg) estimula la actividad locomotora y presenta un efecto ansiolítico frente a la actividad exploratoria y el estrés de la rata cuando se le cambia de lugar (Petkov y col., 1994). La fluoxetina (inhibidor de la recaptación de 5-HT) antagoniza el efecto ansiolítico de la dotarizina (Petkov y col., 1995).

A nivel cardiovascular, los diversos experimentos realizados “*in vitro*” muestran que la dotarizina produce una vasodilatación más marcada sobre la contracción inducida por 5-HT que por KCl en la arteria coronaria de cerdo, mientras que con la flunarizina no se advierten estas diferencias (Montiel y col., 1997). Aunque en experimentos previos carece de efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos, en experimentos realizados en rata y perro “*in vivo*” produce vasodilatación periférica y pulmonar, con un efecto depresor muy escaso sobre la presión arterial, ya que incrementa la fracción de eyección ventricular, con tendencia a aumentar el gasto cardíaco (Cartheuser y col., 1994).

A nivel del sistema nervioso central, la dotarizina inhibe la vasoconstricción inducida por hiperventilación en arterias cerebrales de gato (Chomiccki y col., 1995; Czernicki y col., 1996). También, inhibe la vasoconstricción inducida por 5-HT con mayor potencia sobre la arteria basilar y aorta de conejo que la inducida por NA (Brasó y col., 1990). Así mismo, la contracción inducida por KCl y PGF_{2α} es inhibida ligeramente en mayor medida en la arteria basilar respecto a la coronaria de cerdo. La dotarizina induce una vasodilatación dependiente de endotelio en la arteria basilar de cerdo a diferencia de la coronaria (Eisert y col., 1994). La dotarizina presenta una mejora del flujo cerebral sanguíneo y una disminución de la resistencia cerebral vascular en experimentos “*in vivo*”, realizados en cabra, así como una relajación dosis dependiente de la arteria cerebral media de cabra (Torregrosa y col., 1999). Por otro lado, la dotarizina muestra un ligero efecto antagonista de los receptores de dopamina D₂ en cerebro de rata (Onozuka y col., 1996a). La CI₅₀ es 20 veces superior con dotarizina frente a flunarizina (Onozuka y col., 1996b) y en ensayos clínicos a corto plazo no parece presentar reacciones extrapiramidales (Farré y col., 1997).

En otros estudios preclínicos en los que se ha evaluado este nuevo fármaco se ha podido constatar que la dotarizina inhibe la contractilidad vascular y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ del músculo liso de las arterias basilar y aorta del conejo (Tejerina y col., 1993), así como las corrientes de entrada a través de los canales de calcio neuronales voltaje-dependientes (Villarroya y col., 1995; Lara y col., 1997) y es capaz de liberar calcio desde depósitos intracelulares (Novalbos y col., 1999a,b). Además, como acabo de comentar, la dotarizina bloquea los receptores de serotonina, de aquí que sus efectos terapéuticos puedan ser debidos a sus propiedades antiserotoninérgicas y/o calcio-antagonistas, pudiendo actuar de forma diferente sobre distintos lechos vasculares (Ruiz-Nuño y col., 2001), lo que podría resultar en un efecto beneficioso como tratamiento preventivo en pacientes migrañosos..

Con respecto a los ensayos clínicos en fase I, se han realizado dos ensayos clínicos diferentes con dos grupos de 8 voluntarios sanos. Uno de ellos es aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo. Se administra oralmente una dosis única de dotarizina 50, 100 y 200 mg/día. El otro estudio es en abierto y se administra 50 mg dos veces al día durante 14 días. Los resultados obtenidos presentan una excelente tolerancia de las tres dosis en comparación con el placebo y de las dosis repetidas administradas en abierto (Farré y col., 1997)

Los diversos ensayos clínicos en fases II y III realizados hasta la fecha han demostrado su eficacia en el tratamiento profiláctico de la migraña. Los estudios iniciales encontraron una eficacia superior a la del placebo con la dosis de 50 mg cada 12 h. Así, en un estudio controlado con 3 dosis de dotarizina (25, 100 y 200 mg/día en dos tomas) frente a placebo con 247 pacientes evaluables puso de manifiesto una reducción significativa frente a placebo del número de días con migraña para las dosis de 100 y 200 mg/día y de la frecuencia de las crisis de migraña para la dosis de 200 mg/día (Diamond y col., 1999). En otro estudio en el que se comparaba la administración de dotarizina con la de pizotifeno y la de flunarizina, se observó que con los tres fármacos se reduce la frecuencia de la crisis en más de un 50%, no existiendo diferencias en el grado de eficacia respecto al placebo con los tres fármacos (Titus y col., 1999).

Más recientemente se ha postulado que, entre otros mecanismos, la dotarizina podría actuar bloqueando la liberación de péptidos inflamatorios de las terminaciones nerviosas trigeminales, por inhibir la entrada de calcio que dispara el mecanismo secretor. Así, la

administración de dotarizina a pacientes migrañosos podría actuar previniendo la activación de la fase de liberación de neuropéptidos inflamatorios trigeminales (SP, CGRP, NKA).

OBJETIVOS

Como he descrito en el apartado de Introducción, una de las teorías más aceptadas actualmente sobre la fisiopatología de la migraña es aquella en la que se implican mecanismos neurológicos (liberación de péptidos vasoactivos) y vasculares (fenómenos de vasoconstricción y vasodilatación).

En relación a la liberación de péptidos vasoactivos de las terminaciones nerviosas del trigémino que actúan como neurotransmisores, se sabe que éste es un proceso excitotónico dependiente de la entrada de calcio a la neurona desde el exterior celular, entrada que se produce fundamentalmente a través de CCVD. Se ha visto que entre los distintos subtipos de canales de calcio, los canales P/Q están implicados en el control de la secreción de los neurotransmisores en distintas zonas cerebrales.

Por otro lado, recientemente se ha postulado que algunos tipos de migraña, como por ejemplo la migraña hemipléjica familiar, parece relacionarse con la existencia de distintas mutaciones en el gen que codifica la expresión de la subunidad α del canal de Ca^{2+} del subtipo P/Q (Ophoff y col., 1996; Terwindt, 1998), al igual que ocurre en algunos casos de migraña con o sin aura (Ophoff y col., 1998).

Finalmente, con respecto a los fenómenos vasoactivos que pueden aparecer en un paciente con migraña, se sabe que en muchos lechos vasculares la contracción del músculo liso vascular está regulada por receptores para la serotonina, siendo muy heterogéneos los subtipos de receptores que median esta contracción. Así, por ejemplo, la contracción de la aorta del conejo inducida por 5-HT es mediada por receptores 5-HT_{2A} (Apperly y col., 1976; Feniuk et al., 1985). También, la vasoconstricción inducida por 5-HT en la arteria femoral (Grandaw y Purdy, 1996) y en la arteria vertebral del conejo (Griffith y col., 1982) es mediada por receptores 5-HT₂. Por otro lado, se ha descrito que los receptores 5-HT_{1-like} están involucrados principalmente en la vasoconstricción de la arteria basilar del conejo (Bradley col., 1986). Más recientemente se ha descrito una población mixta de receptores 5-HT_{1-like} y 5-HT_{2A} que median la contracción inducida por 5-HT en la arteria mesentérica del conejo (Yildiz y Tuncer, 1995).

Teniendo en consideración todos estos aspectos implicados en la teoría neurogénica (neurovascular) de la fisiopatología de la migraña, la dotarizina podría resultar un excelente agente preventivo de las crisis migrañosas. Así, se sabe que la dotarizina inhibe la

contractilidad vascular y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ del músculo liso de las arterias basilar y aorta del conejo (Tejerina y col., 1993), así como las corrientes de entrada a través de los canales de calcio neuronales voltaje-dependientes (Villarroya y col., 1995). Además, se ha observado que la dotarizina bloquea receptores de serotonina del subtipo 5-HT_{2A}.

Así, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido profundizar en los posibles mecanismos de acción de la dotarizina que puedan justificar su uso como agente preventivo de las crisis de migraña, basándonos en los datos previos que sugieren su posible utilidad clínica en esta indicación. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la posible selectividad de la dotarizina sobre la contractilidad de distintos lechos vasculares inducida por distintos agentes vasoactivos.
2. Caracterizar los efectos de la dotarizina en los canales neuronales de Ca^{2+} del subtipo P/Q, utilizándose como modelo neuronal las células cromafines bovinas.
3. Caracterizar los efectos de la dotarizina sobre la liberación de neurotransmisores mediada por canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

1.-ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron conejos machos blancos de Nueva Zelanda que se sacrificaron en una cámara de gas, en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Tras la muerte del animal se extrajeron la aorta torácica, la femoral, el cerebro y lecho vascular mesentérico para la realización de los diferentes experimentos. A continuación, se introdujeron estos tejidos en una solución de Krebs Hepes (composición en mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; Cl_2Mg , 1,2; glucosa, 1,98 g/l; HEPES, 2,38 g/l; ajustada a pH: 7,4) y mantenida a 4°C, realizándose la disección de los distintos vasos arteriales (la aorta torácica, la femoral, la vertebral y la cuarta rama de la mesentérica) en el laboratorio. La aorta torácica y la femoral se montaron en un baño de órganos convencional, mientras que la vertebral y la mesentérica en un miógrafo.

También se obtuvieron cerebros bovinos del Matadero Municipal que se transportaron al laboratorio sumergidos en solución Locke (composición en mM: NaCl, 154; KCl, 5,6; $HNaCO_3$, 3,6; glucosa, 5,6 y HEPES, 6; a pH=7,4) y en hielo. Una vez en el laboratorio, se extrajeron las arterias cerebrales media y se montaron en un baño de órganos para estudios de reactividad vascular y de estimulación eléctrica.

1.1.-BAÑO DE ÓRGANOS

Para la realización de nuestros experimentos, se procedió a limpiar previamente de tejido conectivo los segmentos vasculares; se cortaron tiras helicoidales de aorta y anillos de la femoral de unos 2 mm de longitud y se montaron en un baño de órganos que contenía 40 ml de una solución de Krebs-Henseleit de la siguiente composición (en mM): NaCl, 119; KCl, 4,7; $CaCl_2$ 1,5; KH_2PO_4 , 1,2; $MgSO_4$, 1,2; glucosa, 11 y $NaHCO_3$ 25 mM. a 37°C, burbujeándose con carbógeno (una mezcla del 95% de O_2 y el 5% de CO_2).

La colocación de la preparación en el baño de órganos fue diferente según se tratara de anillos vasculares o de tiras helicoidales. Así, cuando se utilizaron anillos, el método consistió en introducir, por la luz de los segmentos cilíndricos vasculares, dos alambres rígidos de acero del tamaño apropiado según el tipo de vaso. Una vez seleccionado el tamaño de estos alambres, uno de ellos se fijó a la pared del baño de órganos de doble camisa y el otro, que se desplaza paralelamente al anterior, se unió a un transductor isométrico de fuerza, el cual se

conectó a un polígrafo o a una interfase MacLab/4e conectada a un ordenador, donde se registraron los cambios de tensión (figura 7). Si en lugar de anillos se trabajaba con tiras helicoidales, se sigue un procedimiento semejante, en el que las tiras helicoidales se colocaban en el baño de órganos sujetas mediante hilos a un transductor de fuerza isométrico acoplado a un registrador por un extremo y por el otro a la varilla de burbujeo.

BAÑO DE ÓRGANOS

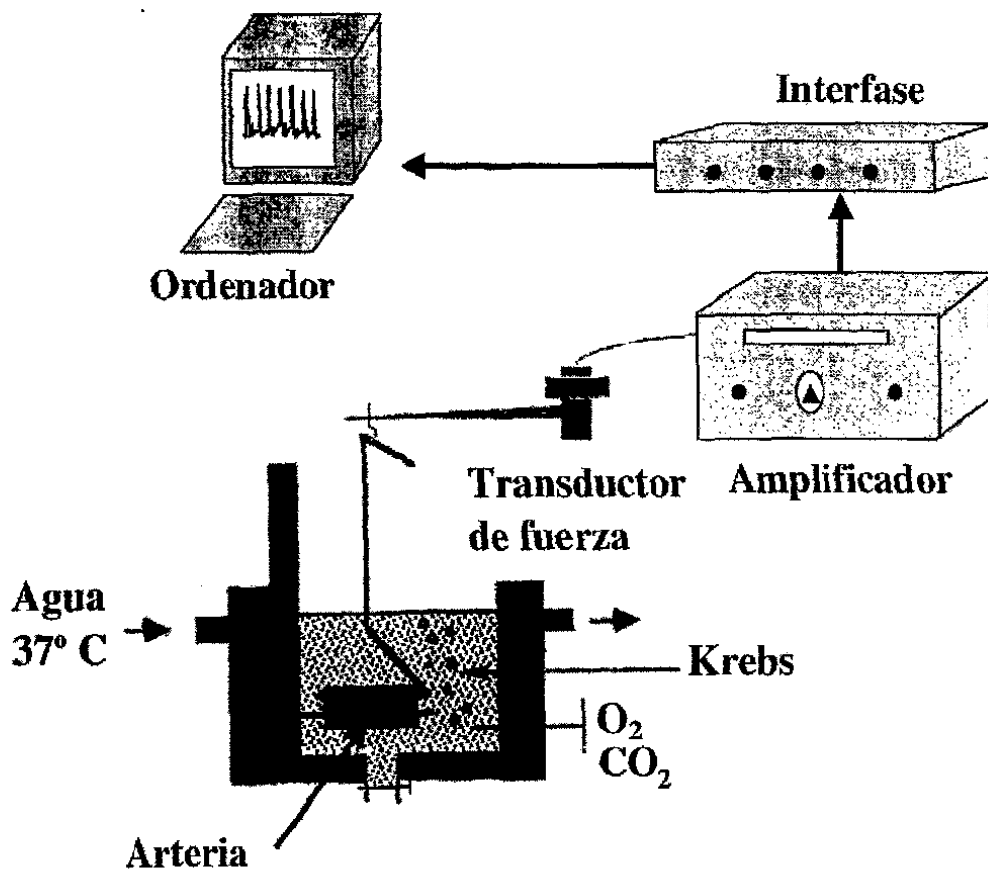


Figura 7.-Representación esquemática del sistema de baño de órganos utilizado para los estudios de reactividad vascular

Una vez en el baño de órganos fue necesario un periodo de adaptación y equilibrado del tejido a nuestras condiciones experimentales. Para ello, las arterias aorta torácica y femoral se equilibraron durante 1 h bajo una tensión basal óptima de 2,5 g y 0,5 g, respectivamente, con lavados repetidos de la preparación. La arteria cerebral media bovina se equilibró con una tensión basal óptima de 1,5 g.

1.2.-MIÓGRAFO DE MULVANY

Para estudiar la reactividad vascular de las arterias de resistencia, se utilizó el método descrito por Mulvany y Halpern (1977). En estos experimentos se utilizaron segmentos de arteria vertebral (1,5-2 mm de longitud, 500-650 μm de diámetro) y de arteria mesentérica (1,5-2 mm de longitud, 200-350 μm de diámetro), que se colocaron en el baño de órganos de un miógrafo (Myo interface model 600M), en el cual, dos alambres de tungsteno de 40 μm de diámetro se introdujeron por la luz de la arteria (figura 8). Uno de estos alambres se conectó a un transductor de fuerza acoplado al miógrafo, el cual registró los cambios de tensión producidos en las arterias. El miógrafo, a su vez, se conectó a un sistema de adquisición de datos (MacLab/4e) y éste a un ordenador personal Macintosh. El otro alambre se unió a un tornillo micrométrico que permitía el estiramiento de las arterias.

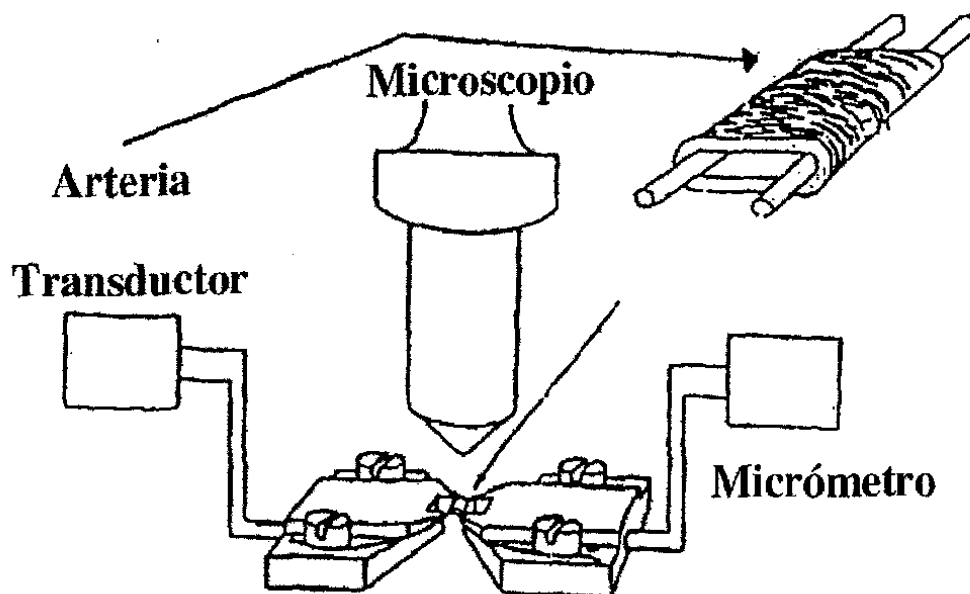


Figura 8.-Representación esquemática de la preparación de arterias de resistencia en el miógrafo de Mulvany

Normalización de las arterias de resistencia

Cuando se trabaja con arterias de resistencia utilizando el miógrafo de Mulvany va a ser crucial la normalización de las condiciones experimentales. Este proceso de normalización se explica por tres razones: la primera, es obvio que el tamaño de estructuras elásticas como los vasos sanguíneos sólo puede tener sentido en condiciones definidas claramente. La segunda, la sensibilidad a los agonistas depende del grado de estiramiento, por lo que para los experimentos farmacológicos se requerirá que las condiciones estén bien definidas. Y por último, la respuesta activa del vaso depende de lo que se haya estirado éste previamente (de acuerdo con la relación entre la tensión activa y la circunferencia interior), por lo que es importante determinar la circunferencia interna del vaso a la cual éste daría su respuesta máxima.

Por todo ello, se ha decidido fijar el tamaño ideal del vaso, como el tamaño que tiene en estado de reposo bajo una presión transmural de 100 mmHg. El objetivo de este procedimiento es determinar la circunferencia interna de un vaso montado en un miógrafo, denominada como IC₁₀₀, que tendría el vaso en estado de reposo y bajo la acción de una presión transmural de 100 mmHg.

En la práctica, la normalización se realiza estirando el vaso lentamente en pequeños pasos y anotando las medidas del micrómetro, en μm y del transductor de fuerza, en mN. La circunferencia interna del vaso se calcula fácilmente de la distancia medida entre los alambres y del diámetro de éstos que es conocido. La longitud de la pared del vaso se determina con una regleta calibrada en la lente de la lupa (la longitud de la pared es igual a dos veces la longitud del segmento porque tenemos la parte de abajo y la de arriba de la pared). La tensión de la pared es la fuerza dividida por la longitud de la pared. La relación de Laplace se usa para calcular la presión efectiva, P_i , siendo $P_i = \text{Tension pared} / (\text{circunferencia interna} / (2 \cdot \pi))$. Esta presión efectiva es la presión que se estima para estirar el vaso hasta la circunferencia interna medida previamente.

Los valores de fuerza, en mN y de estiramiento, en μm , se introducen en el ordenador o en una calculadora programable, con los factores de calibración oportunos y se calcula la presión efectiva correspondiente al estiramiento efectuado. Cuando la presión efectiva excede los 100 mmHg (13,3 kPa) se deja de estirar la preparación. Los datos de la presión y de la longitud de la circunferencia interna (IC₁) se ajustan a una exponencial y utilizando la

ecuación de Laplace, se determina el IC_{100} , punto en la curva que correspondía con la presión de 100 mmHg. Encontrado esto, la IC_{100} se determina como sigue a continuación, $IC_1=0,9 \cdot IC_{100}$, porque se ha visto, por lo menos en arterias mesentéricas de rata que con esta circunferencia interna el vaso contraía con la fuerza máxima óptima. Y el diámetro normalizado de la luz del vaso viene dado por la siguiente fórmula:

$$I_1=IC_1 \cdot \pi$$

Después del proceso de normalización, las arterias se lavaron tres veces y se equilibraron durante un periodo de 30 minutos.

1.3.-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En esta sección describiré brevemente los procedimientos experimentales que se han utilizado en los estudios de reactividad vascular y que serán posteriormente descritos en mayor detalle en la sección de resultados. En todos los casos, los siguientes protocolos experimentales se llevaron a cabo después de 1 h. de equilibrado de los diferentes tejidos utilizados.

1.3.1.-Contracción inducida por serotonina

Una vez estabilizadas las preparaciones, se indujo su contracción mediante la adición de 5-HT al baño de órganos, a una concentración final de 10 μ M. Una vez alcanzada la contracción máxima se lavó la preparación con una solución de Krebs-Bicarbonato hasta que la preparación recuperó su contracción basal inicial. A continuación, se volvió a lavar una segunda vez la preparación y, transcurridos 15 min, se indujo de nuevo la contracción mediante una nueva adición de 5-HT al baño.

Este ciclo de inducción de la contracción y lavado (relajación) se repitió hasta obtener al menos 2 contracciones seguidas de la misma magnitud (la altura máxima conseguida en el segundo registro inicial, se consideró como el 100% de contracción). Una vez alcanzada esta situación se procedió con el estudio experimental, adicionando la molécula a ensayar, que se adicionó al baño de órganos o miógrafo a la concentración final deseada durante un período de incubación de unos 15 min, tras el cual se realizó una nueva adición de 5-HT para valorar el efecto de nuestra molécula experimental sobre la contracción inducida por 5-HT. La

relajación inducida por el fármaco se expresó como el porcentaje de la contracción inicial evocada por 5-HT (100%).

Una vez alcanzada la máxima contracción en presencia de nuestro antagonista, la arteria se lavó 1-2 veces con Krebs-Bicarbonato para conseguir la relajación hasta el tono basal y así se pudo aplicar nuevos estímulos.

1.3.2.-Contracción inducida por otros agentes vasoconstrictores

Para evaluar el posible efecto bloqueante de la dotarizina en la contracción evocada por distintos agentes vasoconstrictores, se realizaron experimentos en los se indujo la contracción de tiras helicoidales de la aorta mediante la adición repetida de K^+ (35 mM), NA (10 μ M), Ag II (0,1 μ M), o $PGF_{2\alpha}$ (3 μ M).

Como en el caso de la serotonina, una vez alcanzada la contracción máxima inducida por cada agente vasoconstrictor, se lavó la preparación con una solución de Krebs-Bicarbonato hasta que la preparación recuperó su contracción basal inicial. A continuación, se volvió a lavar una segunda vez la preparación y, transcurridos 15 min, se indujo de nuevo la contracción mediante una nueva adición de 5-HT al baño. Este ciclo de inducción de la contracción y lavado (relajación) se repitió hasta obtener al menos 2 contracciones seguidas de la misma magnitud (la altura máxima conseguida en el segundo registro inicial, se consideró como el 100% de contracción). Una vez alcanzada esta situación se procedió con nuestro estudio experimental, adicionando la molécula a ensayar, que se adicionaba al baño de órganos a la concentración final deseada durante un período de incubación de unos 15 min, tras el cual se realizó una nueva adición del agente vasoconstrictor estudiado para valorar el efecto de nuestra molécula experimental sobre la contracción inducida por este agente. La relajación inducida por el fármaco se expresó como el porcentaje de la contracción inicial (100%).

Para estudiar la posible voltaje-dependencia de los efectos bloqueantes inducidos por las distintas moléculas ensayadas, y en particular la dotarizina, se empleó un protocolo experimental similar al descrito en el párrafo anterior pero con ligeras modificaciones. Brevemente, las tiras helicoidales de la aorta se incubaron en una solución de Krebs sin calcio en condiciones hiperpolarizantes (1,2 mM K^+ /0 Ca^{2+}) y despolarizantes (100 mM K^+ /0 Ca^{2+}) durante un período de 15 min. A continuación, se indujo la contracción de las arterias

hiperpolarizadas sustituyendo la solución del baño por otra que contiene 100 mM K⁺/1,5 mM Ca²⁺ y en las arterias despolarizadas simplemente se adicionó Ca²⁺ al baño de órganos para obtener la concentración final de 1,5 mM de Ca²⁺. Cuando se consigue la contracción máxima, las preparaciones se lavaron hasta alcanzar, otra vez, el tono basal. Después de obtener dos contracciones reproducibles, las preparaciones se incubaron 15 min con nuestro fármaco experimental en las dos condiciones experimentales (hiperpolarizante y despolarizante), tras el cual se indujo de nuevo la contracción del vaso. La relajación inducida por el fármaco en condiciones hiperpolarizantes o despolarizantes se expresó como el porcentaje de la contracción inicial (100%) obtenida en cada caso.

1.3.3.-Contracción inducida por estimulación eléctrica transmural

En estos experimentos se pretendió valorar las alteraciones de la liberación de NA por nuestra molécula experimental, estudiando las diferencias observadas entre la contracción inducida por estimulación eléctrica (que actuaría liberando NA desde terminaciones nerviosas de la pared vascular) en condiciones basales, en presencia y ausencia de inhibidores de la NOS.

Para ello, se utilizó la arteria cerebral media bovina, que se disecó cuidadosamente del cerebro bovino y se preparó en forma de anillos de 4 mm de longitud que se colocaron en un baño de órganos con solución Krebs-Henseleit para medir la reactividad vascular. El protocolo experimental se ha descrito previamente (Marín y Balfagón, 1998) y consiste en la aplicación de hasta tres trenes sucesivos de estímulos eléctricos (0,3 ms; 4 Hz (baja frecuencia) y 8 Hz (alta frecuencia); 200 mA; durante 30 s) con un intervalo entre ellos de 40 minutos. Las respuestas contráctiles al estímulo eléctrico fueron repetitivas. El inhibidor de la síntesis de NO utilizado, L-NAME, que se administró 20 minutos antes del segundo o tercer tren de estímulos. Nuestras moléculas experimentales (dotarizina y flunarizina) se administraron en ausencia o presencia de L-NAME antes del segundo o tercer tren de estímulos, respectivamente.

2.-CULTIVOS CELULARES

2.1.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

Las células cromafines de la médula adrenal bovina se aislaron a partir de glándulas adrenales de vacas adultas, siguiendo un protocolo estandarizado (Livett, 1984), con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Moro y col., 1990). Brevemente, las glándulas extraídas del animal en el matadero se transportaron en medio de Locke (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) cuya composición es (en mM): 154 ClNa, 5,6 ClK, 3,6 HNaCO_3 , 5,6 glucosa, 5 HEPES, a pH 7,2) y al que se añadió una combinación de antibióticos (penicilina-estreptomicina y gentamicina) y antifúngicos (fungizona).

Una vez en la unidad de cultivos, se retiró el tejido graso periadrenal y se inició una fase de adecuación y lavado mediante la inyección de Locke con una jeringa a través de la arteria adrenomedular, manteniéndose las glándulas en un baño a 37°C. Este procedimiento de lavado se repitió varias veces con el objetivo de eliminar los eritrocitos existentes en el sistema vascular de la glándula. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática con colagenasa al 0,25% y albúmina bovina al 0,5%, que se disuelven en solución de Locke. En esta fase se inyectaron unos 3,5 ml de la solución de colagenasa a cada glándula a través de la arteria adrenomedular y se incubaron de nuevo a 37°C para permitir una acción óptima de la colagenasa. La inyección de esta enzima se repitió hasta un total de 3 veces a intervalos de 20 min.

Una vez finalizada la fase de digestión, las glándulas se seccionaron longitudinalmente y se extrajo la médula ya digerida. La colagenasa se lavó mediante la adición de grandes volúmenes de Locke, filtrándose la suspensión obtenida a través de una malla de nylon con un poro de 217 μm , lo que permitió eliminar pequeños pedazos de médula no digerida. La suspensión que se obtuvo se centrifugó a 120 xg durante 10 min para sedimentar las células. Después de la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en Locke, obteniéndose una nueva suspensión celular que se filtró a través de una malla de 82 μm de poro, que permitió eliminar fibras y grasa.

Posteriormente se realizó una separación y purificación en gradiente de Percoll para lo cual se añadió Percoll estéril a la suspensión celular y se centrifugó durante 20 min a 20.000

xg a 20-25°C. Tras esta centrifugación se diferenciaron varias bandas en el gradiente, entre las que cabe destacar una banda superior, que contiene células cromafines mixtas (adrenérgicas y noradrenérgicas) y una capa inferior de cromafines, fundamentalmente adrenérgicas.

Tras recoger las células contenidas en estas dos capas se procedió a lavar el Percoll mediante la adición de grandes cantidades de Locke y su posterior centrifugación (10 min a 120 xg). A continuación se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en DMEM para realizar un segundo lavado del Percoll. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó de nuevo y el precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspendió en DMEM al que se le añadió un 5% de suero fetal, inhibidores de fibroblastos (10 μ M de arabinósido de citosina y 10 μ M de fluorodeoxiuridina), y antibióticos (50 IU ml⁻¹ de penicilina y 50 μ g ml⁻¹ de estreptomicina). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, en una atmósfera saturada de agua y con un 5% de CO₂.

Para los estudios electrofisiológicos, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro a una densidad aproximada de 5x10⁴ células/ml. Para los estudios de secreción de catecolaminas en poblaciones celulares las células se sembraron en placas Petri de 10 cm de diámetro, a una densidad aproximada de 500.000 células/ml.

La célula cromafín como modelo de neurona

El término paraneurona fue propuesto por Fujita en 1976 para designar a aquellas células que, aunque no pueden considerarse como auténticas neuronas, se encuentran relacionadas con éstas en términos de estructura, función y metabolismo. Según Kobayashi, para considerar una célula como paraneurona, ésta debe sintetizar sustancias idénticas o relacionadas con los neurotransmisores o neurohormonas; además, debe poseer vesículas sinápticas o secretoras y, por último, liberar su material secretor en respuesta a un estímulo que actúe sobre un receptor situado en la membrana celular (Fujita y col., 1976; Kobayashi, 1977; Fujita y col., 1988).

Las células cromafines reúnen todas las características anteriores; así, sintetizan, almacenan y liberan catecolaminas en respuesta a la activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos por la acetilcolina liberada del nervio esplácnico (Douglas y Poisner, 1965;

Wilson y Kirshner, 1977). Además, comparten muchas propiedades con las neuronas simpáticas, como el mismo origen embriológico (cresta neural), capacidad de disparar potenciales de acción (Brandt y col., 1976), y presencia de canales iónicos para Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , los cuales son sensibles a los cambios en el potencial de membrana (Fenwick y col., 1982). Pero lo dicho hasta ahora no es todo, ya que las células cromafines son capaces de emitir prolongaciones al co-cultivarlas con astroglia o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso (Unsicker y col., 1980; Uceda y col., 1995). Finalmente, el hecho de que las células cromafines puedan aislarse con facilidad y mantenerse en cultivos primarios, justifica que estas células se empleen como un excelente modelo neuronal.

2.2.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NEURONAS SIMPÁTICAS

Las neuronas simpáticas se aislaron a partir del ganglio simpático paravertebral de ratas neonatas de un día de vida. Se cultivaron siguiendo un método descrito previamente (Wakade y col., 1982; 1988). Brevemente, el ganglio, una vez disecado, se digirió con tripsina (0,1%) en una solución salina tamponada con fosfatos y las células se dispersaron por trituración. Las neuronas (500.000 células/pocillo, en placas de 24 pocillos) se mantuvieron en medio Dulbecco F12 suplementado con insulina, transferrina y factor de crecimiento neuronal en cubres con polilisina. Las neuronas simpáticas se usaron después de 6 ó 7 días del cultivo primario.

3.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS (“PATCH-CLAMP”)

A lo largo de los últimos 60 años se han desarrollado tres técnicas electrofisiológicas que han propiciado el avance en el conocimiento de los mecanismos de membrana fundamentales que permiten la transducción de la información y la comunicación neuronal. Estas son el registro intracelular, las técnicas de fijación de voltaje y el registro de corrientes elementales haciendo uso de la técnica denominada “patch-clamp” (Hille, 1992).

La técnica de “patch-clamp” es una variación de la técnica de fijación de voltaje y consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño trozo de membrana; de esta forma, midiendo la corriente necesaria para mantener dicha diferencia de potencial, se puede cuantificar el flujo de iones a través de dicho trozo de membrana (Hamill y col., 1981). Esta

técnica permite el registro de corrientes a nivel microscópico, pudiendo medirse corrientes del orden de pA. En esta técnica se emplea únicamente un electrodo tanto para registro de voltaje como para el registro de corriente.

El primer paso en la ejecución de la técnica de "patch clamp" es la formación de un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana y la punta de la pipeta. Para ello se utiliza una pipeta de cristal cuya punta ha sido pulida al fuego que posee un diámetro de aproximadamente 1 μm . La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, formando un sello eléctrico con una resistencia del orden de 50 M Ω . La alta resistencia de este sello asegura que la mayoría de las corrientes originadas en un pequeño parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta, y de allí al circuito de medida de corriente. Además, la elevada resistencia del sello contribuye a que exista un bajo nivel de ruido en los registros, al evitar el flujo de corriente entre pipeta y baño.

Bajo condiciones apropiadas (mantener limpia la superficie de la pipeta) y mediante la aplicación de una ligera succión al interior de la pipeta se pueden conseguir sellos pipeta-membrana celular con resistencias de 10-100 G Ω , conocidos como "giga-sellos", que reducen el ruido del registro en un orden de magnitud, y permiten fijar el potencial de un parche de membrana. Además, estos sellos son mecánicamente muy estables, lo que permite realizar cierto número de manipulaciones mecánicas que dan lugar a las distintas configuraciones de esta técnica, entre las que cabe destacar (figura 9):

3.1.-CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ADHERIDA O PARCHE "IN SITU" ("CELL-ATTACHED")

Dicha configuración es la que se consigue cuando la punta de la pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se aplica una ligera succión al interior de la pipeta, formándose un gigasello entre la membrana y la punta de la pipeta (figura 9).

Esta configuración permite el registro de las corrientes que fluyen a través de uno o varios canales presentes en el parche de membrana que está en la punta de la pipeta. Presenta los inconvenientes que la solución intracelular no puede ser controlada por el investigador y que el potencial de membrana no se conoce con precisión sino que sólo es estimado. Esta configuración permite, por tanto, el registro de corrientes unitarias manteniendo intacta la composición del medio intracelular, lo que es muy útil para estudio de modulación de canales

iónicos por segundos mensajeros. Esta es la configuración usada para la realización de los experimentos en canal aislado.

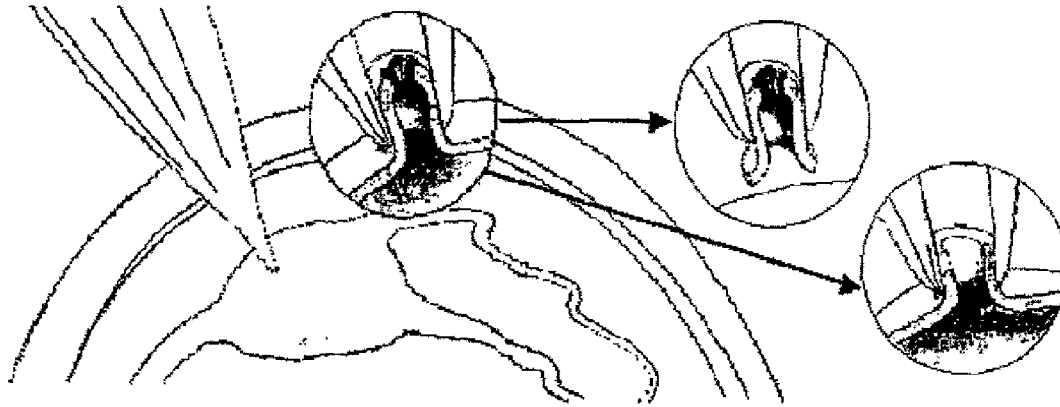


Figura 9.-Esquema que muestra las distintas configuraciones de las técnicas de "patch-clamp" (adaptado de Hamill y col., 1981)

3.2.-CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ENTERA

Esta configuración se obtiene a partir de la configuración de célula adherida ("cell-attached"). La posterior aplicación de una suave succión o presión negativa puede causar la rotura del parche de membrana que hay bajo los bordes de la pipeta (figura 9). Esto permite la comunicación entre el interior de la pipeta y el medio intracelular, con lo que la pipeta de "patch" ahora registra la actividad de la totalidad de canales iónicos presentes en la membrana celular. Inmediatamente tras la ruptura del parche de membrana, la solución intracelular se equilibra con la solución del interior de la pipeta, que tiene un volumen muchísimo mayor, en especial los iones inorgánicos.

Las ventajas de esta técnica con respecto a la técnica clásica de fijación de voltaje con dos electrodos son que ésta se puede aplicar a células pequeñas, en las que sería imposible introducir dos electrodos, permite un cierto control sobre la composición intracelular y

presenta una buena relación señal-ruido, lo que permite el registro de corrientes de muy pequeña intensidad. La principal limitación de esta configuración es la pérdida gradual de componentes intracelulares, principalmente segundos mensajeros, que puede causar una eventual desaparición de la respuesta modulada por estos compuestos.

Registro y análisis de las corrientes de Ca^{2+} en células cromafines bovinas

Para el registro de las corrientes globales a través de canales de Ca^{2+} en células cromafines bovinas se fabricaron pipetas a partir de capilares de vidrio de borosilicato, mediante un estirador vertical de microelectrodos en dos pasos. A continuación se pulió la punta de la pipeta con ayuda de una microforja, para conseguir pipetas con una resistencia de de 2-4 M Ω , montadas sobre el preamplificadores de un amplificador de "patch clamp" DAGAN 8900, que permite la eliminación de los transitorios capacitativos y la compensación electrónica de las resistencias en serie. Para la estimulación celular y la adquisición de datos se utilizó una interfase Labmaster, conectada a un ordenador PC y el programa informático pClamp. La adquisición de los registros de corriente se realizó a una frecuencia de muestreo de 10-20 KHz, filtrándose a 10 KHz.

Para la realización de estos experimentos, los cubreobjetos de vidrio conteniendo la células se colocan en una pequeña cámara de metacrilato montada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot. Esta cámara se perfunde constantemente con una solución control Tyrode que contiene (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES/NaOH, ajustada a pH 7,4. Para el registro de las corrientes a través de canales de Ca^{2+} , en la mayoría de los experimentos mostrados en esta Tesis se va a emplear 2 ó 10 mM de Ba²⁺ en vez de Ca^{2+} como catión transportador de cargas. Para suprimir las corrientes de Na⁺ se utilizó TTX a una concentración de 5 μ M. Las células son dializadas con una solución intracelular que contiene (en mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 20 TEA.Cl, 5 Mg.ATP, 0,3 Na.GTP, 14 EGTA, 20 HEPES/CsOH, ajustada a pH 7,2.

A las células se les fijó el potencial de membrana en -80 mV, y, generalmente, se aplicaron pulsos despolarizantes de 50 ms de duración a distintos potenciales, a intervalos de 10 s. Para el análisis de los resultados se descartaron aquellas células que presentaban un marcado lavado ("rundown") de las corrientes a través de canales de Ca^{2+} (Fenwick y col., 1982). Para eliminar posibles artefactos derivados de las corrientes inespecíficas de fuga, así como de las corrientes capacitativas, éstas se sustraen usando las corrientes generadas por la

aplicación de pulsos hiperpolarizantes, o bien mediante la sustracción de las corrientes insensibles a Cd^{2+} registradas con el mismo protocolo.

El cambio de las soluciones extracelulares se realizó mediante un sistema de válvulas controladas electrónicamente, conectado a una pipeta de perfusión común cuya punta se posicionaba a menos de 100 μm de la célula bajo experimentación. El flujo de este sistema de perfusión se controlaba por gravedad, manteniéndose una velocidad de flujo $<1 \text{ ml min}^{-1}$, de tal modo que se produce un cambio total de la solución que baña la célula en menos de 100 ms. Todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente (22-24°C).

3.3.-CONFIGURACIÓN DE PARCHE PERFORADO

Esta es una variación de la configuración en célula entera que también permite el registro de corriente a través de todos los canales abiertos en la totalidad de la membrana pero con la ventaja que se evita el lavado de la corriente y la pérdida de componentes intracelulares. Esta configuración se obtiene por la inclusión en la solución del interior de la pipeta de "patch" de moléculas como nistatina, anfotericina o gramicidina, que forman poros en el parche de membrana bajo la punta de la pipeta.

Para trabajar en esta configuración primero hay que conseguir la configuración de célula adherida y esperar a que se formen los poros de nistatina, anfotericina o gramicidina sin aplicar ninguna succión al electrodo. Los poros que forman estas moléculas son fundamentalmente permeables a iones monovalentes y permiten el acceso eléctrico al interior celular. Los registros de corriente se realizan sin pérdida de componentes intracelulares ya que dichos canales son impermeables a moléculas del tamaño de la glucosa o superiores. Esta configuración resulta de especial utilidad cuando se quieren estudiar procesos dependientes de segundos mensajeros.

3.4.-CONFIGURACIÓN DE PARCHE ESCINDIDO

Estas son las configuraciones ideales para estudiar las corrientes unitarias que fluyen a través de un solo canal cuando, adicionalmente, se quiere controlar la composición de la solución intracelular y/o extracelular.

La configuración **exterior-fuera** ("outside-out") se obtiene a partir de la configuración de célula entera mediante un ligero estiramiento de separación de la pipeta de la célula, lo que ocasiona una estrangulación de la membrana y la posterior excisión de un trozo de la misma del resto de la célula. Al romperse de esta manera la membrana, lo que inicialmente era membrana externa va a quedar en contacto con la solución externa, mientras que lo que era membrana interna de la célula va a quedar en contacto con la solución del interior de la pipeta de "patch". Esta configuración se utiliza cuando se desea aplicar cambios rápidos en la solución extracelular, por ejemplo, para estudiar los efectos de diferentes iones o agentes farmacológicos aplicados al lado extracelular de la membrana.

La configuración **interior-fuera** ("inside-out"; figura 9) se obtiene a partir de la configuración de célula adherida. Una vez obtenido el sello se retira la pipeta junto con un pequeño trozo de membrana, de tal forma que el lado intracelular queda en la parte externa de la pipeta, en contacto con el baño (que actuará como solución intracelular). La membrana extracelular va a quedar, por tanto, en contacto con la solución de la pipeta. Esta configuración se utiliza cuando se quiere estudiar el efecto de los cambios en la composición de la solución intracelular, por ejemplo, para estudiar el efecto de diferentes iones, segundos mensajeros y agentes farmacológicos a nivel intracelular.

4.-ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

4.1.-LIBERACIÓN DE NORADRENALINA TRITIADA.

Los métodos detallados de la medida de la liberación de [³H]-NA se han descrito previamente en la literatura (Wood y Bunge, 1975; Wakade y Wakade, 1988). Brevemente, las neuronas simpáticas se incubaron en presencia de [³H]-NA (4 µCi/ml de una solución de Krebs-HEPES; incubadas durante 1 h a 37°C). A continuación, las células se lavaron repetidamente, para eliminar el exceso de radiactividad y se recogieron muestras cada minuto, que nos sirvieron para determinar la liberación de [³H]-NA espontánea (basal). Posteriormente, las neuronas se estimularon con una solución despolarizante conteniendo 70 mM de K⁺ y se recogieron tres muestras cada minuto, durante y después de la estimulación; este valor se consideró el 100% de la liberación. Para estudiar el efecto de nuestras moléculas experimentales, éstas se incubaron durante 10 min, antes de la estimulación de la liberación con 70 mM de K⁺. Al final de los experimentos, las células se lavaron dos veces con Krebs-

HEPES y se añadió 1 ml de ácido tricloroacético (al 10%) para lisar las células. Posteriormente, se rasparon los pocillos, se aspiró su contenido y se colocó en un vial de plástico al que se añadió 3,5 ml de líquido de centelleo. Estos tubos se contaron durante 10 min en un contador de centelleo marca 1500 TRI-CARB (PACKARD). Esta medida permite calcular el contenido total de [^3H]-NA en nuestra preparación.

La liberación de [^3H]-NA se expresó en forma de c.p.m. netas y como el porcentaje respecto al contenido total de [^3H]-NA.

4.2.-MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES

Para la realización de estos experimentos, en una microcámara de 200 μl de volumen se depositaron 5×10^6 células cromafines bovinas que se perfundieron a temperatura ambiente (22-24°C) con una solución Krebs-HEPES con la siguiente composición (en mM): NaCl 144, KCl 5,9, MgCl_2 1,2, CaCl_2 2, glucosa 11, HEPES 10, ajustada a pH 7,4. La velocidad de perfusión fue de 2 ml min^{-1} .

El líquido que fluye procedente de dicha cámara, donde se han perfundido las células, pasa a través de un detector electroquímico, modelo Metrohm AG CH9100 Hersau, trabajando en modo amperométrico (Borges y col., 1986). Este detector aplica una corriente de oxidación de +650 mV, voltaje al que se va a producir la oxidación de las catecolaminas presentes en el líquido de perfusión, con lo que se generan dos electrones por cada molécula de catecolaminas oxidada. El detector electroquímico detecta los electrones, generando una corriente de oxidación que quedará registrada en un ordenador PC, controlado por un programa informático desarrollado en lenguaje BASIC (figura 10).

La secreción de catecolaminas fue estimulada mediante la perfusión de las células con soluciones despolarizantes (enriquecidas en K^+), cuya aplicación, al igual que la del resto de soluciones experimentales se realizó mediante electroválvulas controladas electrónicamente.

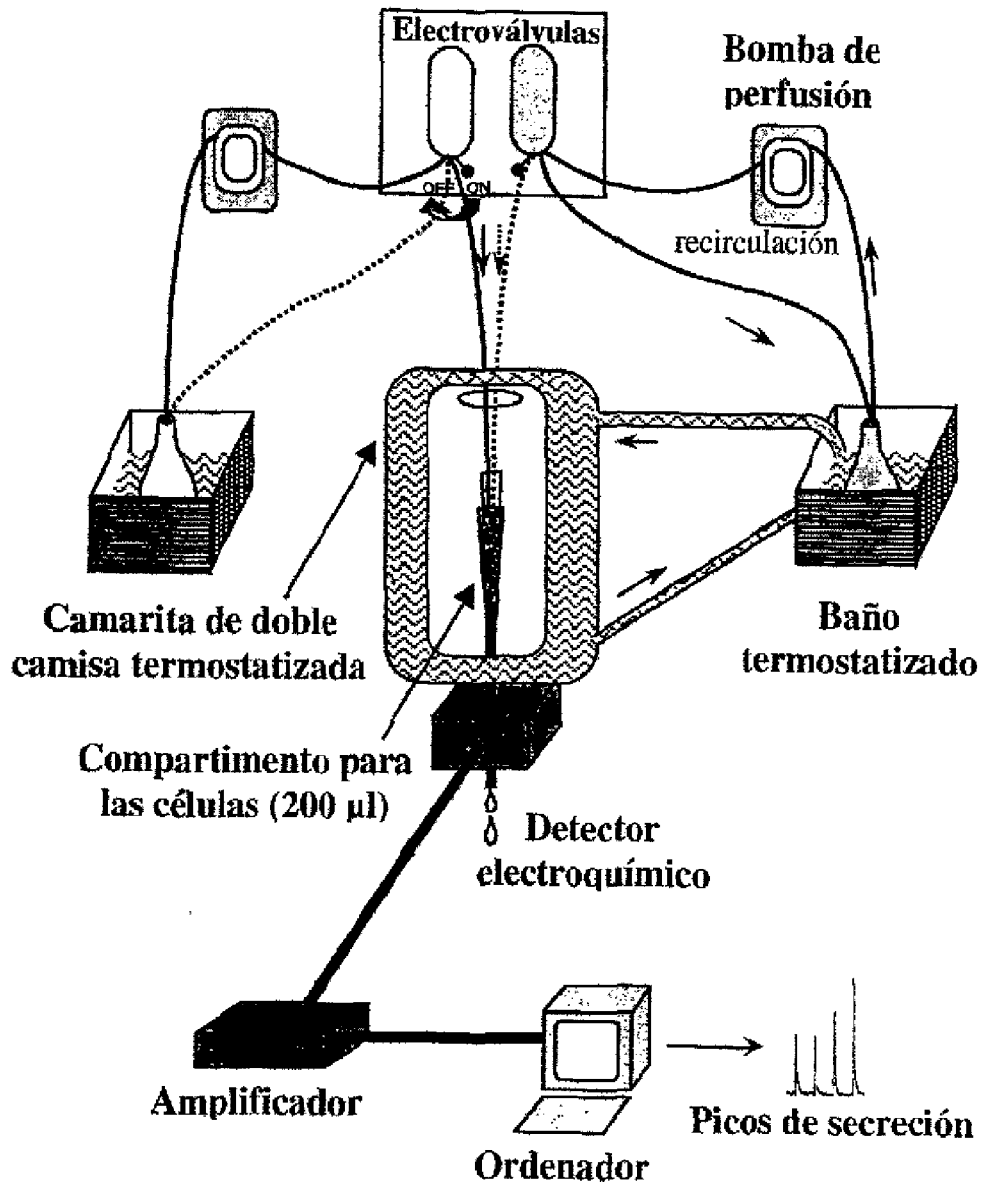


Figura 10.-Representación esquemáticamente del sistema utilizado para estudiar la secreción de catecolaminas en tiempo real en poblaciones de células cromafines bovinas.

RESULTADOS

1.-ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

1.1.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR SEROTONINA EN DIVERSOS LECHOS VASCULARES

Estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio habían demostrado que la 5-HT no inducía una contracción mantenida como, por ejemplo el K^+ , sino que una vez alcanzada la contracción máxima, presentaba una fase de relajación a pesar de seguir en presencia de 5-HT. Estos experimentos nos indicaban que no era posible estudiar el efecto de posibles moléculas con acción vasodilatadora utilizando este protocolo experimental con aplicaciones crónicas de 5-HT. Como método alternativo, se ensayó el efecto contráctil de aplicaciones "fásicas" de 5-HT, a intervalos de 15 min.

Como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, para estudiar el posible efecto vasodilatador de la dotarizina y otras moléculas comparativas, una vez estabilizada la preparación, se indujo su contracción mediante la adición de 5-HT al baño de órganos o miógrafo, a una concentración final de 10 μ M. Una vez alcanzada la contracción máxima se lavó la preparación con una solución de Krebs-Bicarbonato hasta que recuperó su contracción basal inicial; a continuación, se volvió a lavar una segunda vez la preparación y, transcurridos 15 min, se indujo de nuevo la contracción mediante la adición de 5-HT al baño.

Un experimento típico, mostrando este protocolo, se muestra en la figura 11A, donde se muestran los registros obtenidos con un segmento de la arteria vertebral, se equilibra inicialmente durante 1 h y luego se contrae con 10 μ M de 5-HT. Una vez alcanzado el pico de contracción la arteria se lavaba. Al aplicar nuevamente 5-HT al cabo de 15 min, se produjo una respuesta contráctil de amplitud similar, alrededor de 8 mN.

Una vez obtenidas al menos dos contracciones control reproducibles procedimos adicionando la molécula a ensayar, al baño de órganos a la concentración final deseada durante un periodo de incubación de unos 15 min, tras el cual se realizó una nueva adición de 5-HT para valorar el efecto de nuestra molécula experimental sobre la contracción inducida por 5-HT, como se muestra en la figura 11B.

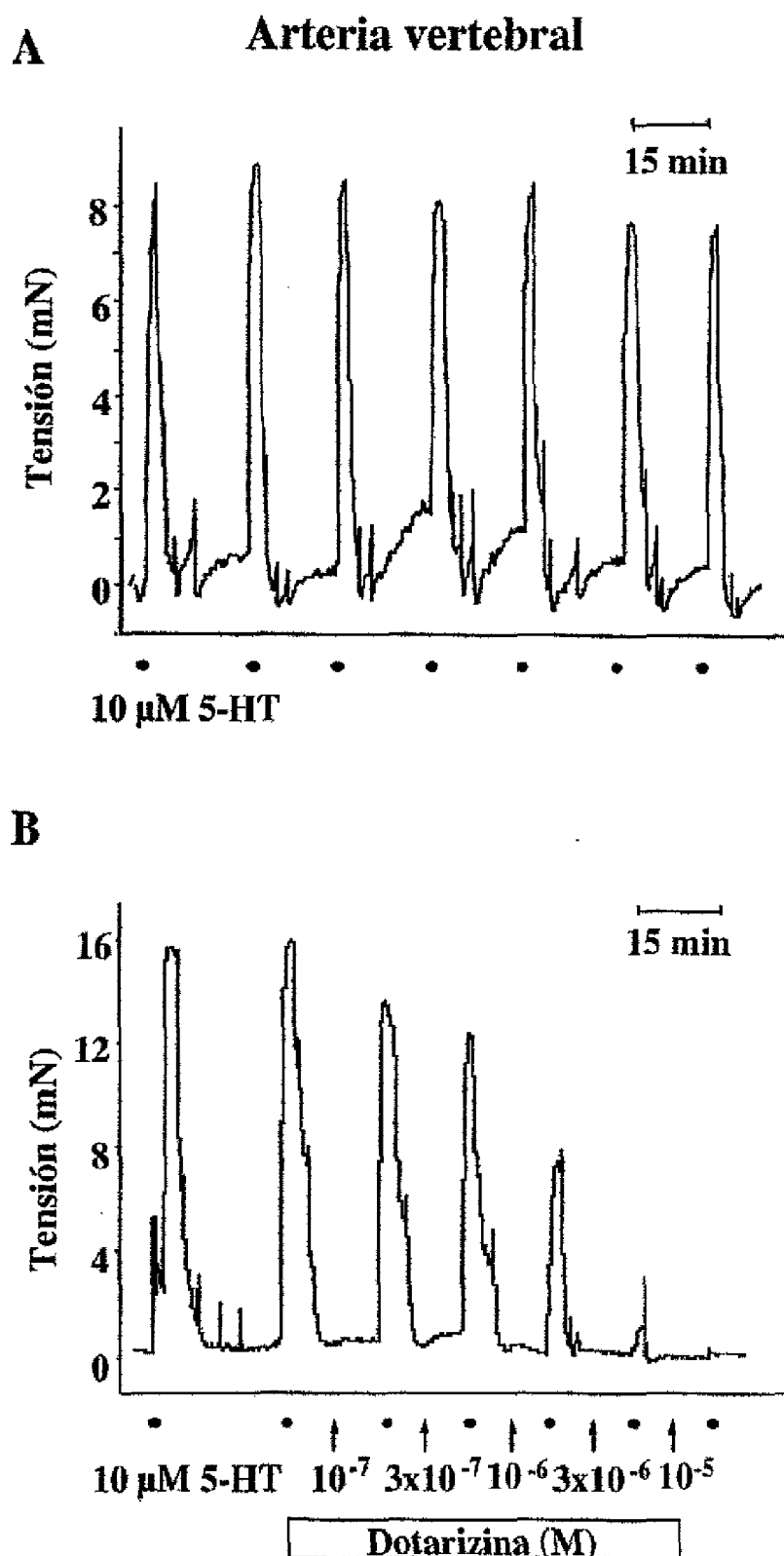


Figura 11.-Registros originales de la contracción inducida por 5-HT en arteria vertebral de conejo. La contracción se indujo con 5-HT 10 μ M en ausencia (panel A) o en presencia de concentraciones crecientes de dotarizina (panel B). La adición de 5-HT se representa por puntos en la parte inferior de la curva. La dotarizina fue añadida a concentraciones crecientes 15 min antes y durante la aplicación de 5-HT. La fuerza de contracción se expresó en mN (en ordenadas).

El efecto contráctil de la adición de 5-HT se estudió en distintos lechos vasculares, siendo la amplitud de la respuesta contráctil inicial en respuesta a la adición de 10 μM de 5-HT de $0,770 \pm 13$ g (8 mN, $n=6$) en la arteria vertebral, de $0,31 \pm 0,01$ g (3,5 mN; $n=6$) en la arteria mesentérica (4ª rama), de $1,75 \pm 0,08$ g (18 mN; $n=6$) en la aorta, y $2,46 \pm 0,23$ g (24 mN; $n=6$) en la arteria femoral. En todas las preparaciones, la adición repetida de 10 μM de 5-HT provocó contracciones reproducibles durante periodos de hasta 3 h.

En la figura 11B se representa un experimento típico en el que se ha ensayado el efecto de la aplicación de concentraciones crecientes de dotarizina. Como puede observarse, la dotarizina produjo un bloqueo de la contracción concentración-dependiente, siendo 0,1 μM la concentración mínima (umbral) que produjo un bloqueo de la contracción de la arteria vertebral inducida por 10 μM de 5-HT. El máximo bloqueo se obtuvo con 10 μM de dotarizina.

Con este protocolo experimental realizamos curvas concentración-respuesta de ketanserina (un bloqueante de receptores 5-HT₂), dotarizina y flunarizina en los distintos lechos vasculares (arteria aorta, vertebral, femoral y mesentérica). Los resultados obtenidos se representan en la figura 12. Como puede observarse en esta figura, la ketanserina fue el bloqueante más potente en los cuatro vasos (CI_{50} en el rango submicromolar; véase tabla 7); la dotarizina también bloqueó las contracciones a 5-HT en todos los vasos estudiados, pero con una CI_{50} unas 10 veces superior (alrededor de 1 μM). Por el contrario, la flunarizina no afectó a la contracción inducida por 5-HT en la aorta y la femoral, incluso a concentraciones de hasta 10 μM . Sin embargo, en los microvasos la flunarizina sí que produjo una clara inhibición de la respuesta a 5-HT, (46% de bloqueo en la arteria vertebral), siendo el efecto sobre la arteria mesentérica similar al observado con la dotarizina (CI_{50} para flunarizina de 0,48 μM , y para dotarizina de 1,09 μM ; ver tabla 7).

Estos efectos diferenciales de la flunarizina podrían explicarse por el efecto calcio-antagonista de la flunarizina, ya que en los microvasos de resistencia la contracción es altamente dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD del subtipo L, debido a que sus depósitos intracelulares de calcio están pobremente desarrollados (Benham y Tsien, 1984), mientras que en las arterias de gran capacitancia la contracción depende principalmente del Ca^{2+} liberado desde depósitos intracelulares (retículo sarcoplásmico), siendo éste menos afectado por la flunarizina.

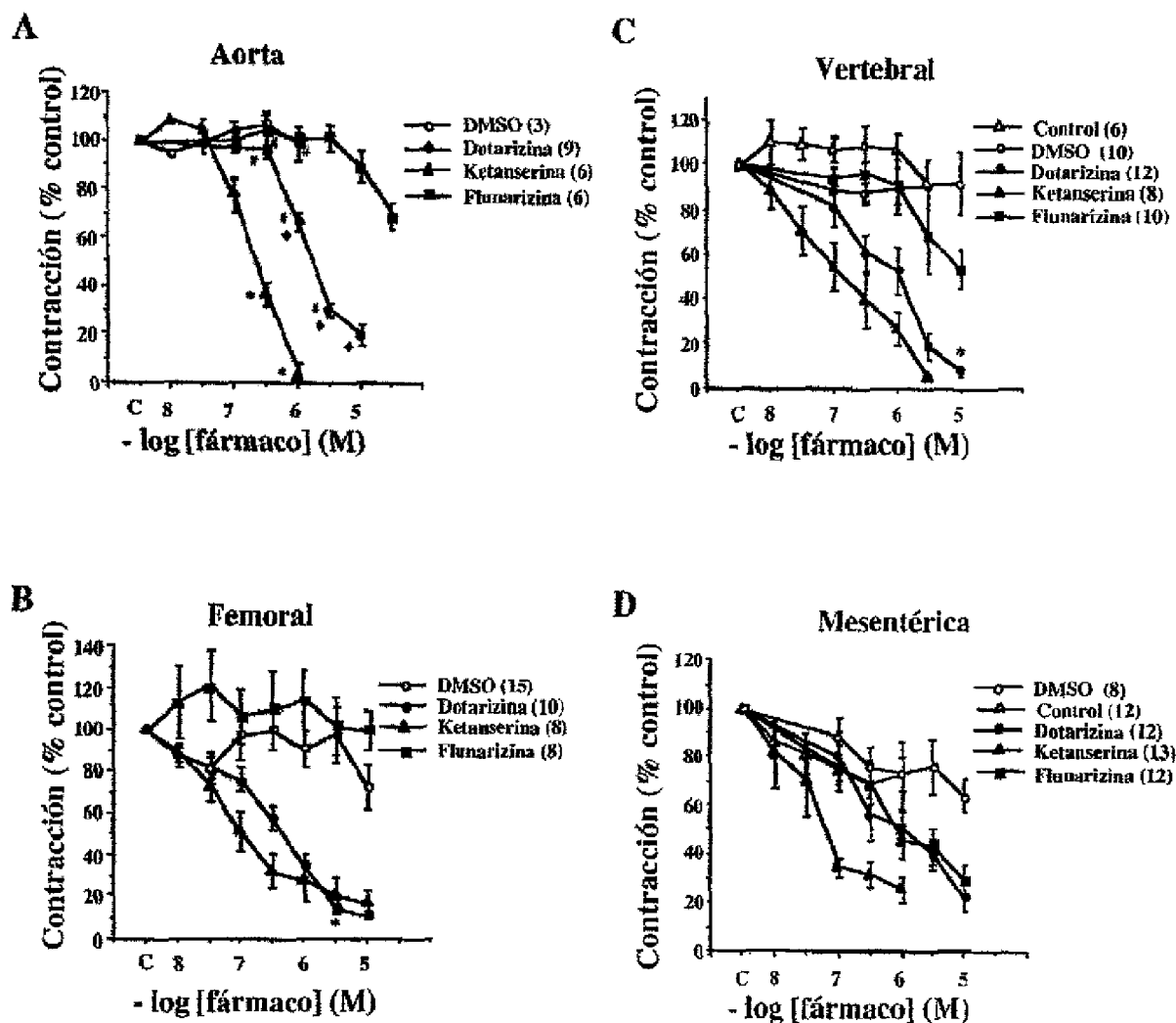


Figura 12.-Efecto antiserotoninérgico de la dotarizina en distintos lechos vasculares. Se realizaron curvas concentración respuesta para ver el bloqueo ejercido por dotarizina, flunarizina o ketanserina en la contracción inducida por 5-HT en la aorta (panel A), femoral (panel B), vertebral (panel C) y mesentérica (panel D) del conejo, siguiendo el mismo protocolo descrito en la figura 11. Se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido) como vehículo. Los datos se expresaron como la media \pm e.e.m. del número de experimentos entre paréntesis. El estudio estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA con comparación múltiple (Scheffe F-test). *, ♦, # indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control, flunarizina o ketanserina, respectivamente.

Tabla 7.-Contracción máxima (g) y CI_{50} (μ M) de la dotarizina, flunarizina y ketanserina en distintos lechos vasculares de conejo contraídos con 5-HT.

LECHOS VASCULARES	CONTRACCIÓN MÁXIMA (g) (n)	CI_{50} (μ M)		
		DOTARIZINA	FLUNARIZINA	KETANSERINA
AORTA	1,75 \pm 0,08 (7)	1,40	ND	0,220
FEMORAL	2,46 \pm 0,23 (10)	0,52	ND	0,053
VERTEBRAL	0,77 \pm 0,13 (8)	1,35	-46,55% inhibición	0,175
MESENTÉRICA (4ª rama)	0,31 \pm 0,06 (30)	1,09	0,48	0,035

ND: No Determinado

1.2.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR OTROS AGENTES VASOCONSTRICTORES

Para probar la selectividad de la dotarizina y la flunarizina en la contracción inducida por 5-HT, se realizaron los siguientes experimentos: Se utilizaron tiras helicoidales de aorta (una para cada agonista) que se contrajeron repetidamente con 35 mM de K^+ , 10 μ M de 5-HT o de NA, 0,1 μ M de Ag II y 3 μ M $PGF_{2\alpha}$. Una vez estabilizadas las tiras, las magnitudes de sus contracciones fueron 1,93 \pm 0.13 g (5-HT), 2,75 \pm 0.01 g (NA), 0,96 \pm 0.06 g (Ag II), y 1,99 \pm 0.12 g ($PGF_{2\alpha}$). Una vez caracterizada la contracción control obtenida en presencia de los diversos agentes vasoconstrictores, los tejidos se incubaron durante 10 min con dotarizina o flunarizina (3 μ M), y se repitió la aplicación del agonista vasoconstrictor pero en presencia del antagonista (una tira para cada agonista). La figura 13 muestra un ejemplo característico de este tipo de experimentos, representándose los efectos bloqueantes de dotarizina (panel B) y flunarizina (panel C) sobre la contracción inducida por la aplicación de 5-HT (10 μ M).

Como puede observarse en la figura 14, la dotarizina (10 μ M) bloqueó un 37,3 \pm 5,8% la contracción inducida por K^+ y la flunarizina (10 μ M) un 26,5 \pm 2,3%. El bloqueo de la contracción inducida por 5-HT fue de un 63 \pm 8,7% para la dotarizina y un 12,2 \pm 2,3 para la flunarizina ($p < 0.01$). Por el contrario, la contracción de la aorta inducida por agentes como la NA, Ag II, $PGF_{2\alpha}$ no fue afectada significativamente por dotarizina ni por flunarizina. Tampoco se afectó la contracción inducida por endotelina 3 nM (datos no mostrados).

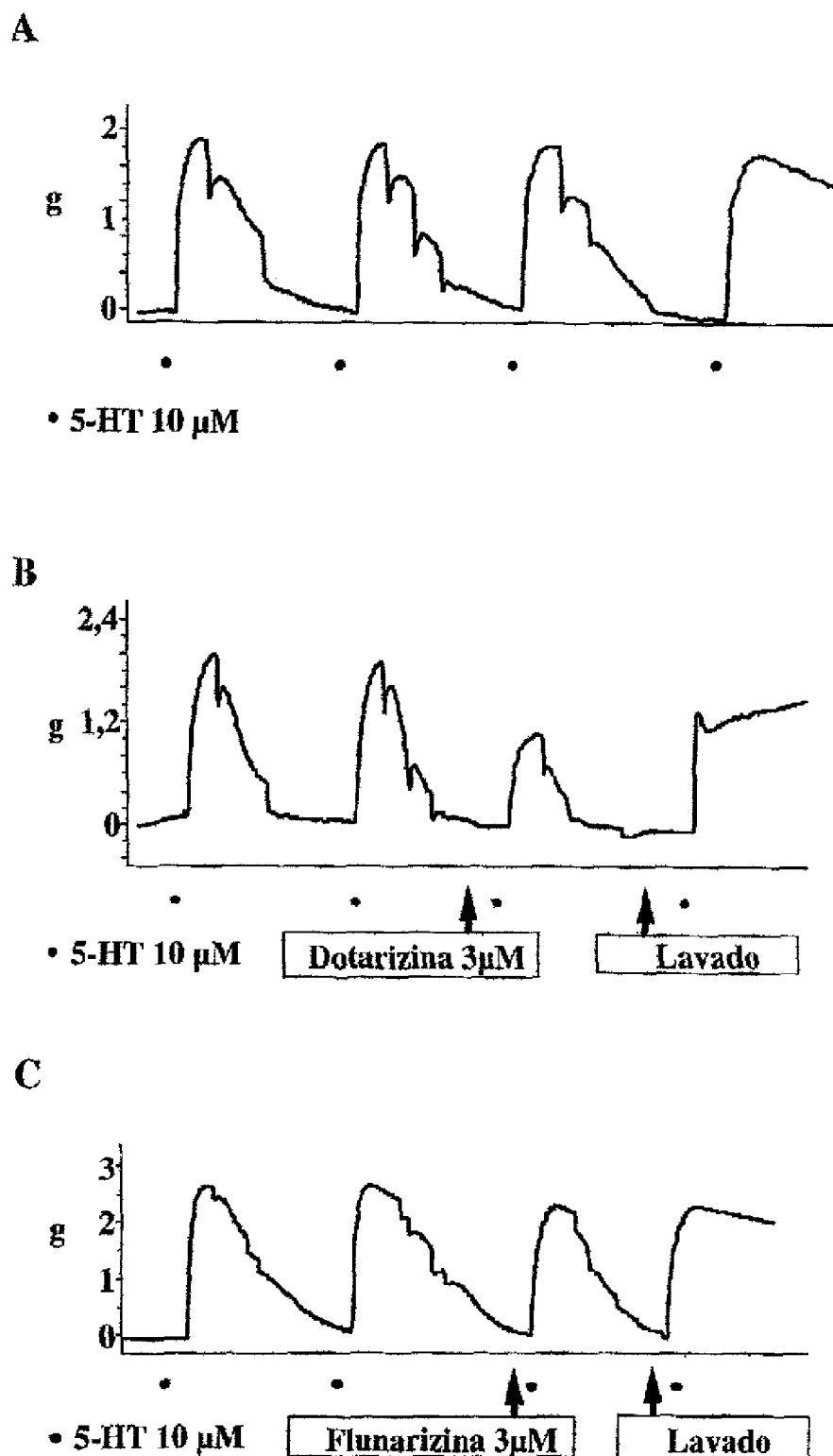


Figura 13.-Registros originales del bloqueo de la dotarizina en la contracción inducida por 5-HT en la aorta de conejo. La contracción se indujo con 10 μ M de 5-HT en ausencia (panel A), o en presencia de de dotarizina 3 μ M (panel B) o de flunarizina 3 μ M (panel C). La adición de 5-HT se representa por puntos en la parte inferior de la curva. Las flechas indican el momento en el que se ha administrado dotarizina o flunarizina y cuando ha comenzado el lavado del fármaco. La fuerza de contracción se expresa en g (en ordenadas). Este mismo protocolo se siguió igual para el resto de agentes vasoconstrictores: K^+ , NA, Ag II y $PGF_{2\alpha}$.

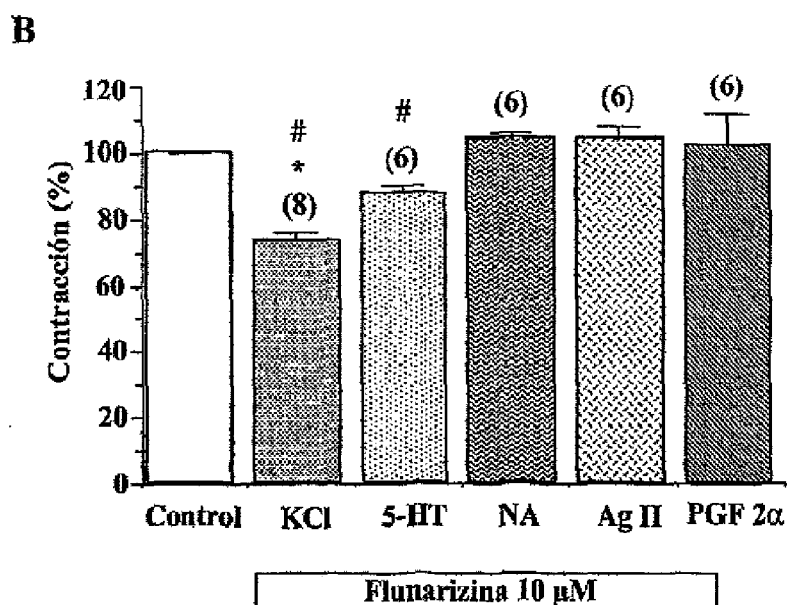
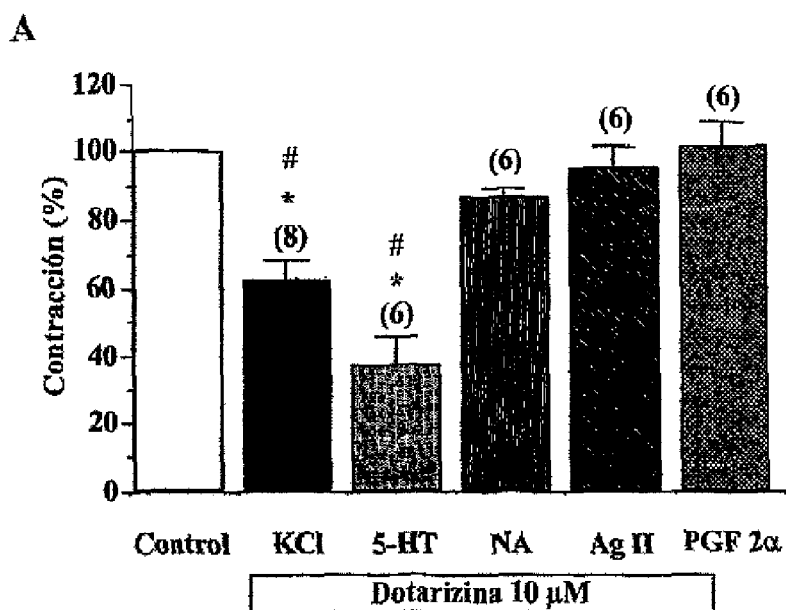


Figura 14.- Selectividad de la dotarizina frente a distintos agentes vasoconstrictores. Se muestra el efecto de la dotarizina (panel A) y de la flunarizina (panel B) en la contracción de la aorta de conejo inducida por distintos agonistas vasoconstrictores: 35 mM de K^+ , 10 µM de 5-HT y de NA, 0,1 µM de Ag II y 3 µM $PGF_{2\alpha}$. Las contracciones obtenidas en presencia del antagonista se expresaron como % del control (ordenadas). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por el test de ANOVA con comparación múltiple adecuada (Fisher PLSD). Los datos son la media \pm e.e.m. del número de experimentos mostrados entre paréntesis. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control; # = diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros agentes vasoconstrictores.

13.-BLOQUEO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA

La dotarizina, además de los canales de Ca^{2+} vasculares, también bloquea los canales de Ca^{2+} neuronales implicados en la liberación del neurotransmisor (Villarroya y col., 1995);

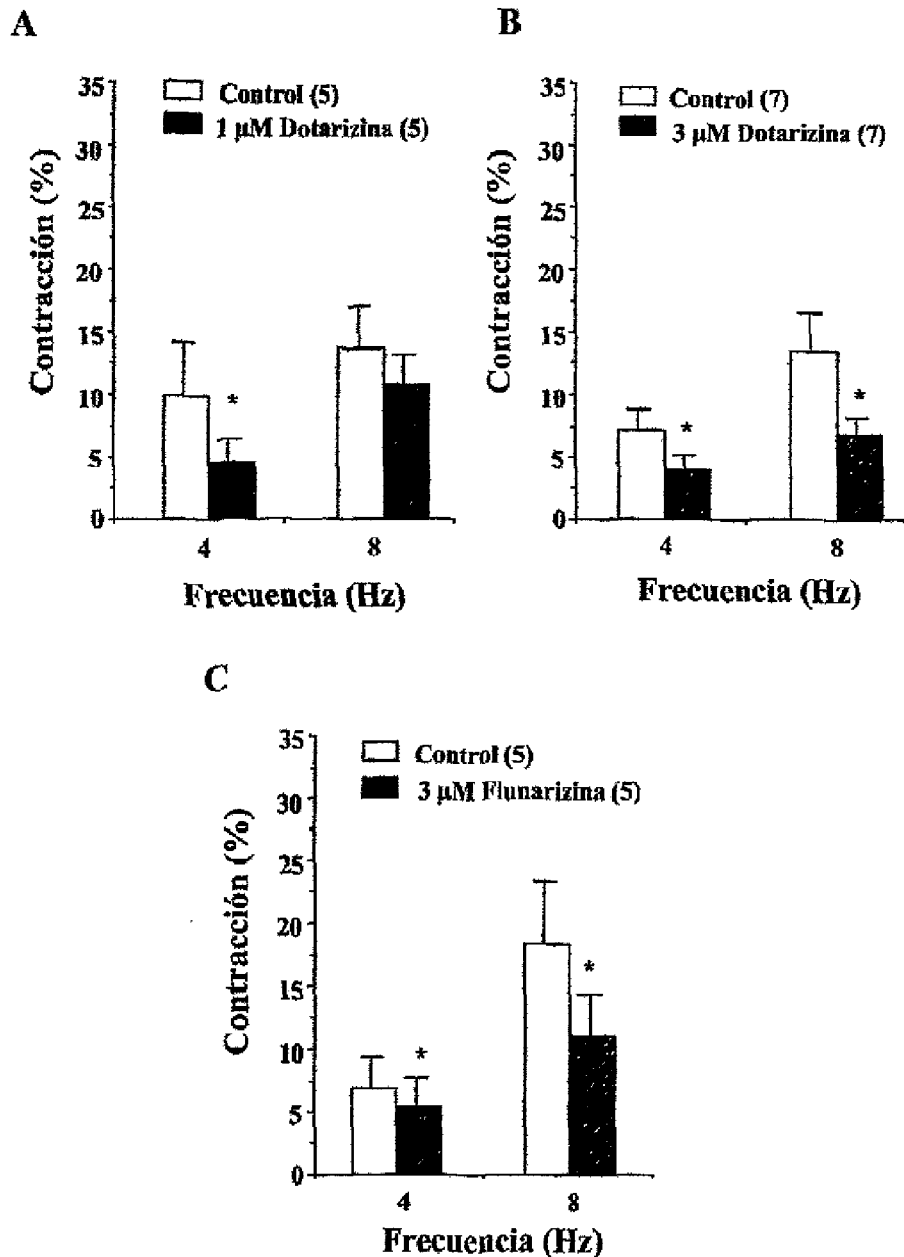


Figura 15.-Efecto de la dotarizina en la contracción inducida por estimulación eléctrica en la arteria cerebral media bovina. Se empleó dotarizina 1 y 3 μM , y flunarizina 3 μM en arterias cerebrales sin endotelio. Los parámetros de estimulación fueron 0,3 ms, 4 u 8 Hz, 200 mA durante 30 s. Los datos responden al % respecto a la respuesta contractil inicial de K^+ 75 mM que es de $3,5 \pm 0,7$ g. Los datos son la media \pm c.e.m. del número de experimentos que se expresan entre paréntesis. * $P \leq 0,05$, son diferencias estadísticamente significativas respecto al control obtenidas con el test de la t de student.

por lo que nos pareció interesante conocer si el fármaco modificaba la contracción de la arteria inducida eléctricamente, que es secundaria a la liberación de NA y dependiente del Ca^{2+} de las terminaciones nerviosas simpáticas (Hardebo, 1992).

En la figura 15 se muestra el efecto que ejercen la dotarizina (1 y 3 μM) y la flunarizina (3 μM) en la contracción inducida por estimulación eléctrica (0,3 ms, 4 y 8 Hz, 200 mA durante 30 s). La contracción fue de $3,5 \pm 0,7$ g (n=29). Los resultados se expresan como % con respecto a la contracción inicial inducida por K^+ 75 mM. La amplitud media de la contracción evocada por la baja (4 Hz) y la alta frecuencia (8 Hz) de estimulación eléctrica fue de 7,5% y 14% respectivamente, frente al % de contracción inicial evocada por el K^+ .

La presencia de 1 μM de dotarizina inhibió significativamente la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica a 4 Hz en un 53 % (n=5), pero no modificó la observada a 8 Hz (21 %, n=5). Dosis más elevadas de dotarizina (3 μM) inhibieron significativamente la respuesta a la estimulación eléctrica en un 44% (n=15) y 53% (n=15) a las dos frecuencias utilizadas 4 y 8 Hz, respectivamente. La presencia de flunarizina 3 μM no modificó la respuesta contráctil a 4 Hz (29%, n=9), mientras que disminuyó la respuesta a 8 Hz (42%, n=9).

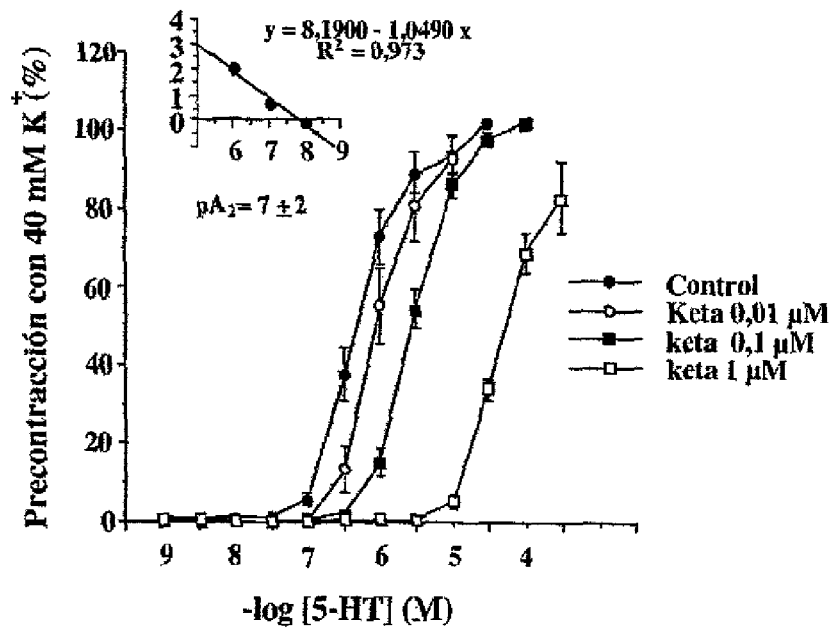
1.4.-ANTAGONISMO DE LOS RECEPTORES DE 5-HT

El bloqueo por dotarizina de la contracción inducida por 5-HT puede ser atribuible a varios mecanismos, entre los que podemos encontrar un posible efecto antiserotoninérgico del fármaco, por lo que resulta imprescindible caracterizar este posible efecto, comparativamente con un conocido agente bloqueante de los receptores de serotonina, como la ketanserina.

Para estudiar el posible efecto antagonista de los receptores 5-HT de la dotarizina, se realizaron curvas concentración-respuesta acumulativas de 5-HT en tiras de aorta, valorándose los posibles efectos de distintas concentraciones de dotarizina (figura 16B) y de ketanserina (figura 16A). Los datos se normalizaron en cada arteria y se expresaron como el % de la contracción inicial inducida por 40 mM de K^+ .

Como puede apreciarse en la figura 16, el mecanismo de acción de la dotarizina como bloqueante de la contracción aórtica inducida por 5-HT parece ser distinto al de la ketanserina. La dotarizina produce un bloqueo dependiente de concentración de la contracción

A



B

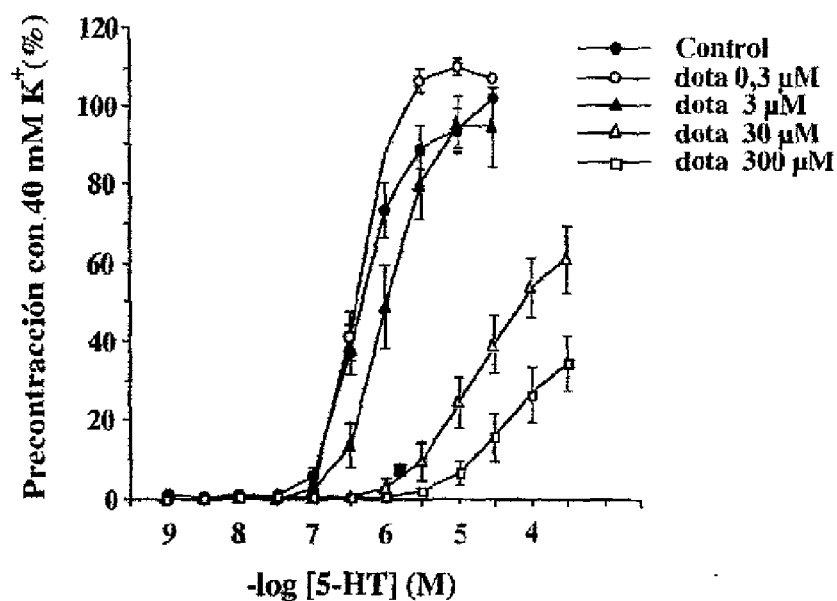


Figura 16.-Curvas concentración-respuesta de 5-HT en tiras de aorta de conejo. Efecto de ketanserina (panel A) y dotarizina (panel B). Sólo se ensayó una concentración del antagonista en cada preparación y los controles en tiras independientes. Los datos se normalizan en cada tira individual, como el % de la contracción inicial inducida con K⁺ 40 mM. Los datos son la media ± e.m. de 6-8 tiras para cada concentración de antagonista.

inducida por 5-HT, produciendo una modificación de las curvas concentración-respuesta compatible con un antagonismo de tipo no competitivo, ya que el desplazamiento de la curva concentración-respuesta de 5-HT no es paralelo (figura 16B) y, en presencia de dotarizina no es posible alcanzar la contracción máxima evocada por 5-HT, incluso incrementando su concentración a 300 μM .

Por el contrario, la ketanserina produjo un desplazamiento paralelo de la curva concentración-respuesta de 5-HT hacia la derecha (figura 16A), lo que confirma que la ketanserina se comporta como un antagonista competitivo de los receptores 5-HT, con un pA_2 de 7,8.

1.5.-VOLTAJE-DEPENDENCIA DEL EFECTO BLOQUEANTE DE DOTARIZINA

Se ha descrito que los derivados dihidropiridínicos presentan un bloqueo voltaje-dependiente sobre el músculo liso vascular (Nelson y Worley, 1989). De ahí que nos haya interesado estudiar la posible voltaje-dependencia de dotarizina y flunarizina, en comparación con nifedipino (prototipo de DHP)

Para estos estudios se empleó un protocolo experimental que consistió en incubación de las tiras helicoidales de la aorta en una solución de Krebs sin calcio en condiciones hiperpolarizantes (1,2 mM K^+ /0 Ca^{2+}) o despolarizantes (100 mM K^+ /0 Ca^{2+}) durante un período de 15 min. A continuación, se indujo la contracción de las arterias hiperpolarizadas sustituyendo la solución del baño por otra que contenía 100 mM K^+ /1,5 mM Ca^{2+} mientras que en las arterias despolarizadas simplemente se adicionó Ca^{2+} al baño de órganos para obtener la concentración final de 1,5 mM de Ca^{2+} . Una vez alcanzada la contracción máxima, las preparaciones se lavaron hasta alcanzar, otra vez, el tono basal. Después de obtener dos contracciones reproducibles, las preparaciones se incubaron 15 min con nuestro fármaco experimental en las dos condiciones experimentales (hiperpolarizante o despolarizante), tras el cual se indujo de nuevo la contracción del vaso. La relajación inducida por el fármaco en condiciones hiperpolarizantes o despolarizantes se expresó como el porcentaje de la contracción inicial (100%) obtenida en cada caso.

La figura 17 muestra una serie de registros originales en los que se ha empleado este protocolo experimental y se ha empleado, dotarizina (3 μM) en condiciones despolarizadas (panel A) e hiperpolarizadas (panel B). Como puede apreciarse, no se encontraron diferencias

significativas entre la solución hiperpolarizante o despolarizante en la contracción control de la arteria aorta de conejo.

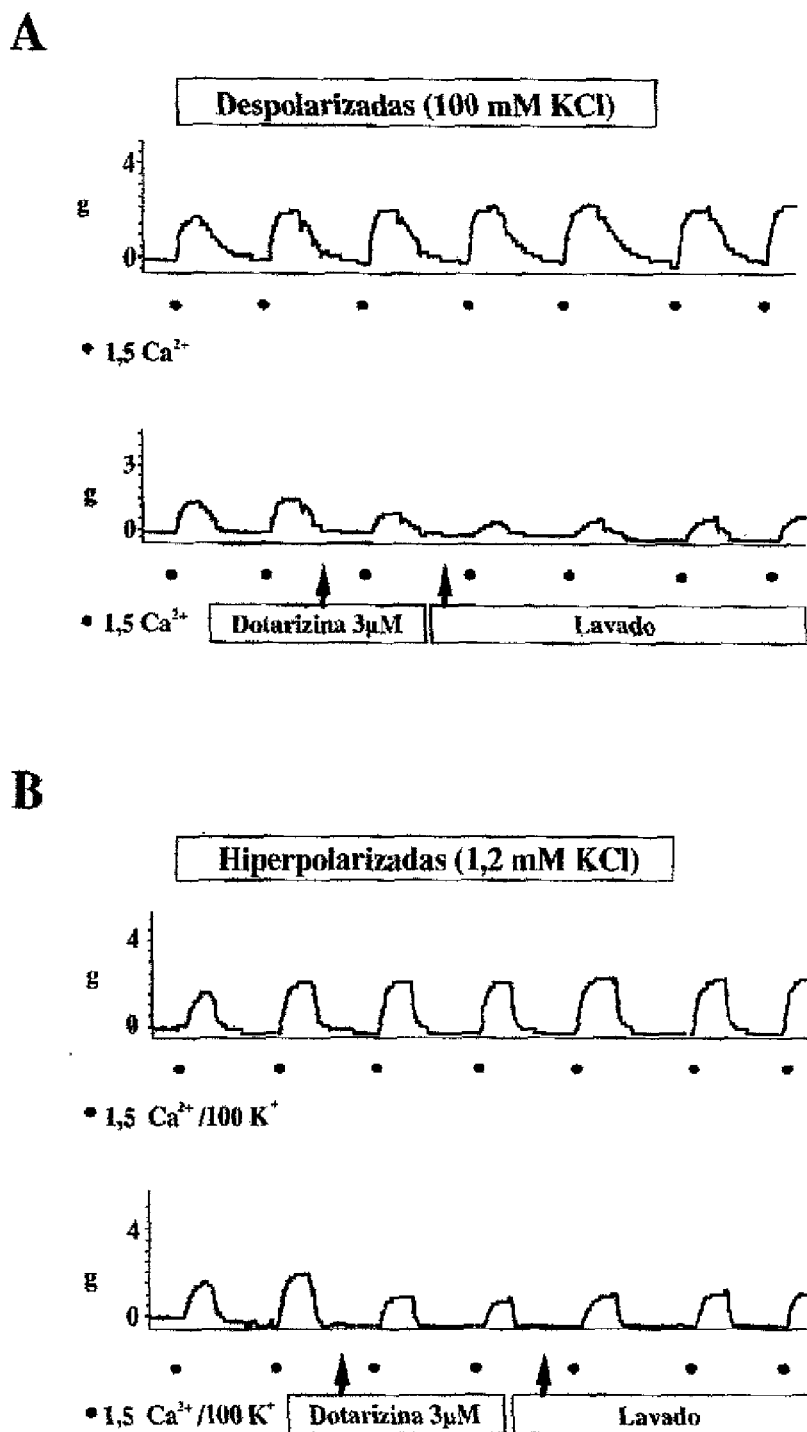


Figura 17.-Registros originales del efecto de la dotarizina en la contracción inducida por 1,5 mM de Ca²⁺ en arterias despolarizadas o hiperpolarizadas de aorta de conejo. La contracción se indujo con 1,5 mM de Ca²⁺ en arterias despolarizadas (panel A), o 1,5 mM de Ca²⁺ más 100 mM de K⁺ en las hiperpolarizadas (panel B). Las arterias despolarizadas se incubaron con 0 Ca²⁺ y 100 mM de K⁺ y las hiperpolarizadas con 0 Ca²⁺ y 1,2 mM de K⁺. La adición de Ca²⁺ o Ca²⁺ más K⁺ se representa por puntos en la parte inferior de la curva. Las flechas indican el momento en el que se administró dotarizina 3 μM. La fuerza de contracción se expresa en g (en ordenadas). El mismo protocolo se realizó también con flunarizina y nifedipino

En la figura 18 se representan los datos medios obtenidos en esta serie de experimentos en los que se ha ensayado la voltaje-dependencia de los efectos bloqueantes de nifedipino, dotarizina y flunarizina. Como puede observarse en la figura, el nifedipino (10 nM) produjo un bloqueo de un 70% (n=8) de la contracción evocada por 1,5 mM de Ca^{2+} , cuando se incubaban las preparaciones con una solución despolarizante (0 Ca^{2+} /100 K^+). Sin embargo, cuando se incubaba el nifedipino en presencia de una solución hiperpolarizante (0 Ca^{2+} /1,2 K^+), el bloqueo de la contracción inducido por este fármaco fue de tan solo un 40% (n=8). Después de 15 y 30 min de lavado, la recuperación de la contracción fue menor cuando las preparaciones fueron incubadas con la solución despolarizante en comparación con la mayor recuperación observada en condiciones hiperpolarizantes.

Al contrario de lo que ocurre con el nifedipino, el bloqueo de la contracción producida por la dotarizina (3 μM ; figura 18B), en las arterias preincubadas con la solución despolarizante es de $41 \pm 3,4\%$ (n=7), muy similar a la observada con la solución hiperpolarizante ($37 \pm 3,6\%$, n=7), lo que sugiere que el efecto bloqueante de la dotarizina no es voltaje-dependiente a diferencia de lo que ocurre con las DHPs. La reversión del efecto después de 1 h de lavado fue de un 20% en ambos casos.

Con la flunarizina 3 μM (figura 18C), sí que se observó un bloqueo más marcado en las arterias despolarizadas ($37 \pm 9,4\%$, n=5) que en las hiperpolarizadas ($17,7 \pm 7,16\%$, n=7) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Es interesante destacar, el efecto bloqueante postfármaco de la flunarizina, no sólo no revirtió el efecto después de 1 h de lavado, sino que se incrementó el grado de bloqueo de la contracción, obteniéndose un bloqueo de un $95 \pm 1\%$ y de un $80 \pm 2\%$ para despolarizadas e hiperpolarizadas, respectivamente, a pesar del largo tiempo de lavado del fármaco. Estos datos sugieren que la flunarizina, a diferencia de la dotarizina, es capaz de acumularse marcadamente en los vasos.

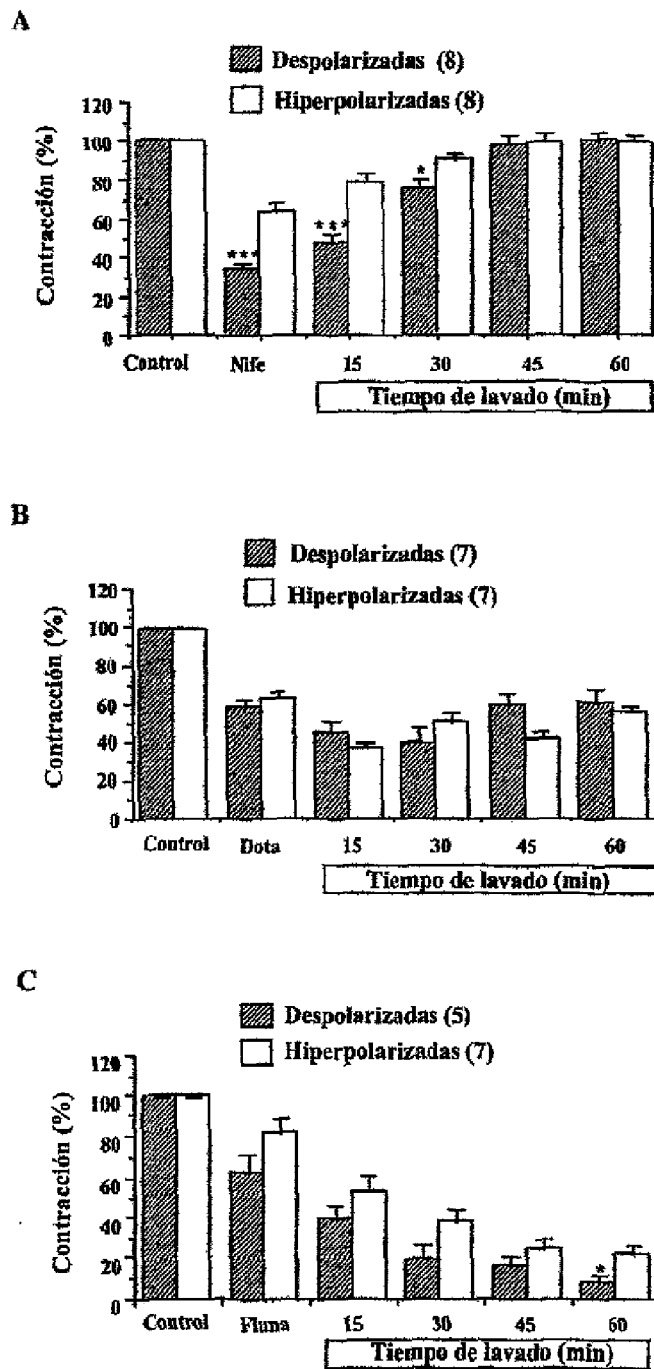


Figura 18.-El efecto con dotarizina no es voltaje-dependiente. Se ha explorado la voltaje-dependencia del nifedipino 10 nM (panel A), de la dotarizina 3 μ M (panel B) y flunarizina 3 μ M (panel C) en tiras helicoidales de la aorta de conejo. Las columnas negras muestran el % de contracción de las arterias que se incubaron con 0 Ca^{2+} y 100 mM de K^{+} ; al cabo de 15 min el tejido se contrajo añadiendo 1,5 mM de Ca^{2+} . Las columnas blancas muestran el % de contracción de las arterias que se incubaron con 0 Ca^{2+} y 1,2 mM de K^{+} . El nifedipino muestra un claro efecto voltaje-dependiente siendo su bloqueo mayor sobre arterias despolarizadas. En cambio no se observa este efecto ni con dotarizina ni con flunarizina. Los datos son la media \pm e.e.m. del número de experimentos mostrados entre paréntesis. * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ son diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el test de la t de student comparando despolarizadas con hiperpolarizadas.

1.6.-DEPENDENCIA DEL $[Ca^{2+}]_e$ DEL EFECTO BLOQUEANTE DE LA DOTARIZINA

Para estudiar la influencia de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre el bloqueo de la contracción producido por la dotarizina, se diseñaron experimentos utilizando arterias cerebrales bovinas. Para normalizar los resultados, todas las preparaciones se contrajeron inicialmente con 70 mM de K^+ y 1,5 mM de Ca^{2+} ; esta contracción se consideró como el 100%. Después, las preparaciones se lavaron hasta que el tono volvió a la línea basal.

Posteriormente, las arterias se preincubaron con una solución despolarizante $0Ca^{2+}/70K^+$ y se añadieron concentraciones crecientes de $[Ca^{2+}]_e$ (0,1-2 mM), para conseguir contracciones graduales de los vasos. La concentración umbral de $[Ca^{2+}]_e$ capaz de conseguir una contracción medible es de 0,1 mM ($0,29 \pm 0,03$ g, $n=4$, que corresponde con un $25,4 \pm 6,63$ % de la contracción inicial evocada por $70K^+/1,5 Ca^{2+}$); la contracción máxima se alcanzó con una concentración de 2 mM de $[Ca^{2+}]_e$ ($2 \pm 0,35$ g; $164 \pm 23\%$, $n=4$). Los datos obtenidos en esta serie de experimentos se recogen en la figura 19.

Como puede apreciarse en la figura 19, en presencia de 1 μ M de dotarizina la amplitud de la contracción se redujo a todas las concentraciones de Ca^{2+} probadas. Al aumentar gradualmente las concentraciones de $[Ca^{2+}]_e$, se indujeron contracciones mayores, pero con dotarizina, no se llegó a alcanzar la contracción máxima obtenida en ausencia de ésta. Con la mayoría de las concentraciones de $[Ca^{2+}]_e$ probadas, la contracción obtenida con dotarizina fue aproximadamente la mitad de la contracción control mientras que con 2 mM de $[Ca^{2+}]_e$ la contracción se aproximó a los valores controles (124 ± 6 % en presencia de 1 μ M de dotarizina frente 164 ± 23 % en ausencia de dotarizina). En presencia de 3 μ M de dotarizina se redujo la contracción evocada por Ca^{2+} en más de un 90 %; en presencia del compuesto, la contracción fue sólo de $0,30 \pm 0,09$ g, comparado con $2,0 \pm 0,3$ g de la contracción control (figura 19).

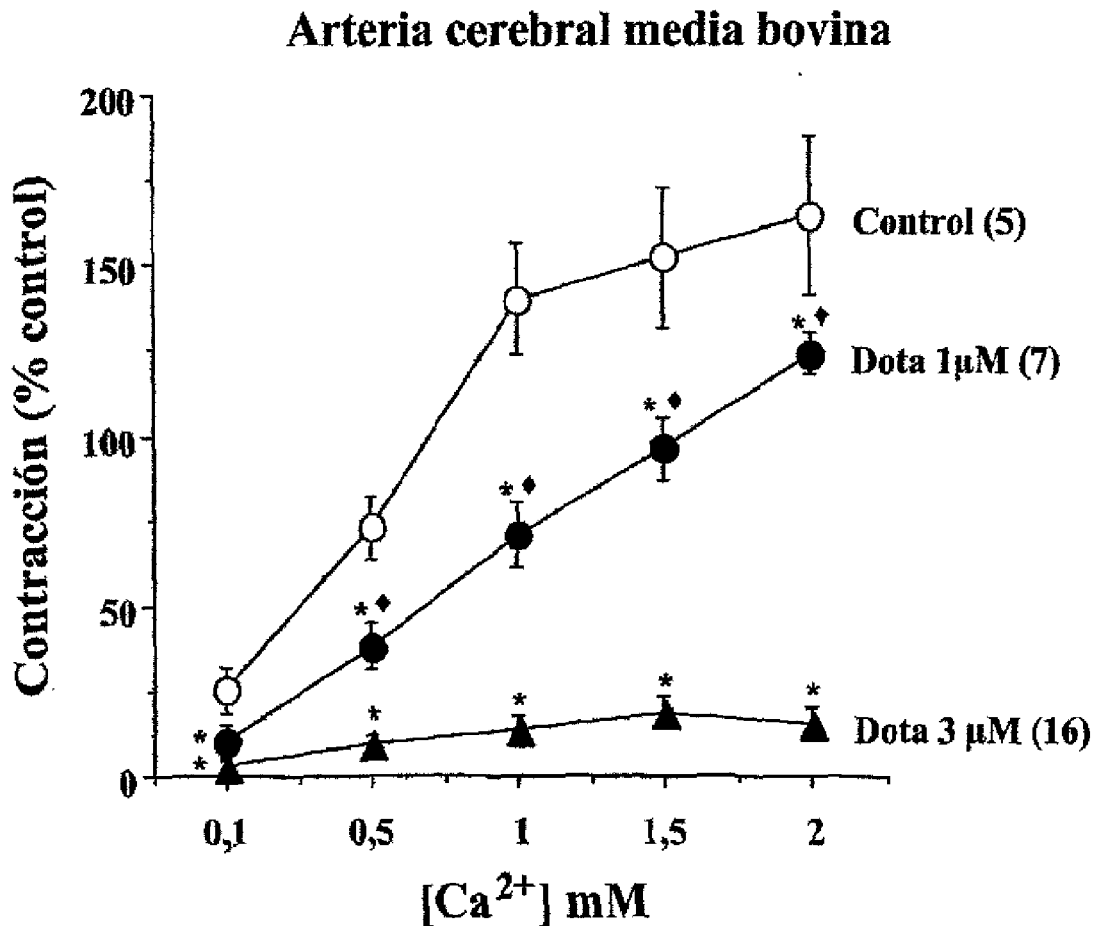


Figura 19.-Efecto bloqueante de la dotarizina en la contracción inducida por Ca^{2+} en la arteria cerebral media bovina. Los resultados se normalizaron considerando el 100 % de la contracción, a las arterias contraídas inicialmente con K^+ 70 mM y Ca^{2+} 1,5 mM. Luego las arterias se lavaron y se incubaron en una solución de K^+ 70 mM y Ca^{2+} 0 mM. Entonces la contracción se indujo mediante la adición de concentraciones acumulativas de Ca^{2+} (en abscisas), en ausencia (control) o en presencia de dotarizina 1 ó 3 μM . Los datos representan la media \pm e.e.m. del número de experimentos mostrados entre paréntesis. El estudio estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA con comparación múltiple (Scheffe F-test). *, ♦ indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la curva control y a la curva de dotarizina 3 μM , respectivamente.

2.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

En todos los experimentos que describiremos a lo largo de esta sección se ha empleado la configuración de célula entera de las técnicas de registro electrofisiológico en fijación de voltaje (patch-clamp). Como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos, esta configuración nos permite el registro de las corrientes globales que fluyen a través de todos los canales iónicos presentes en la membrana celular. Esta técnica también nos permite controlar la composición de las soluciones intra y extracelulares, con lo que seremos capaces de registrar selectivamente las corrientes de entrada a través de determinados subtipos de canales de calcio.

Para el registro selectivo de las corrientes globales de calcio será imprescindible el bloqueo de otras corrientes iónicas presentes en la célula cromafin. Para ello, como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos, empleamos una solución extracelular que contiene 5 μM de TTX, una toxina que bloquea potently las corrientes de entrada rápida de Na^+ y se dializará el interior celular con una solución que contiene mayoritariamente iones Cs^+ (que no permea a través de los canales de K^+) y 20 mM de TEA (un bloqueante de canales de K^+). Para el registro de corrientes globales de Ca^{2+} también se emplean otras manipulaciones experimentales como son la inclusión de un quelante de Ca^{2+} , el EGTA, en la solución intracelular (que evitará el acúmulo de cationes divalentes en el interior celular) y en muchos experimentos se sustituimos el Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} , ya que este ión permea más fácilmente a través de los canales de Ca^{2+} de alto umbral, lo que permite registrar corrientes de mayor intensidad.

2.1.-DISECCIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES DE CALCIO DEL SUBTIPO P/Q

Se realizaron una serie de experimentos iniciales para establecer las condiciones experimentales que nos permitieran diseccionar farmacológicamente las corrientes de entrada a través de los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q del resto de subtipos. Así, primeramente se realizaron curvas I/V para identificar el potencial de estimulación al que se obtiene la corriente máxima, utilizando como catión transportador de cargas al Ba^{2+} , a una

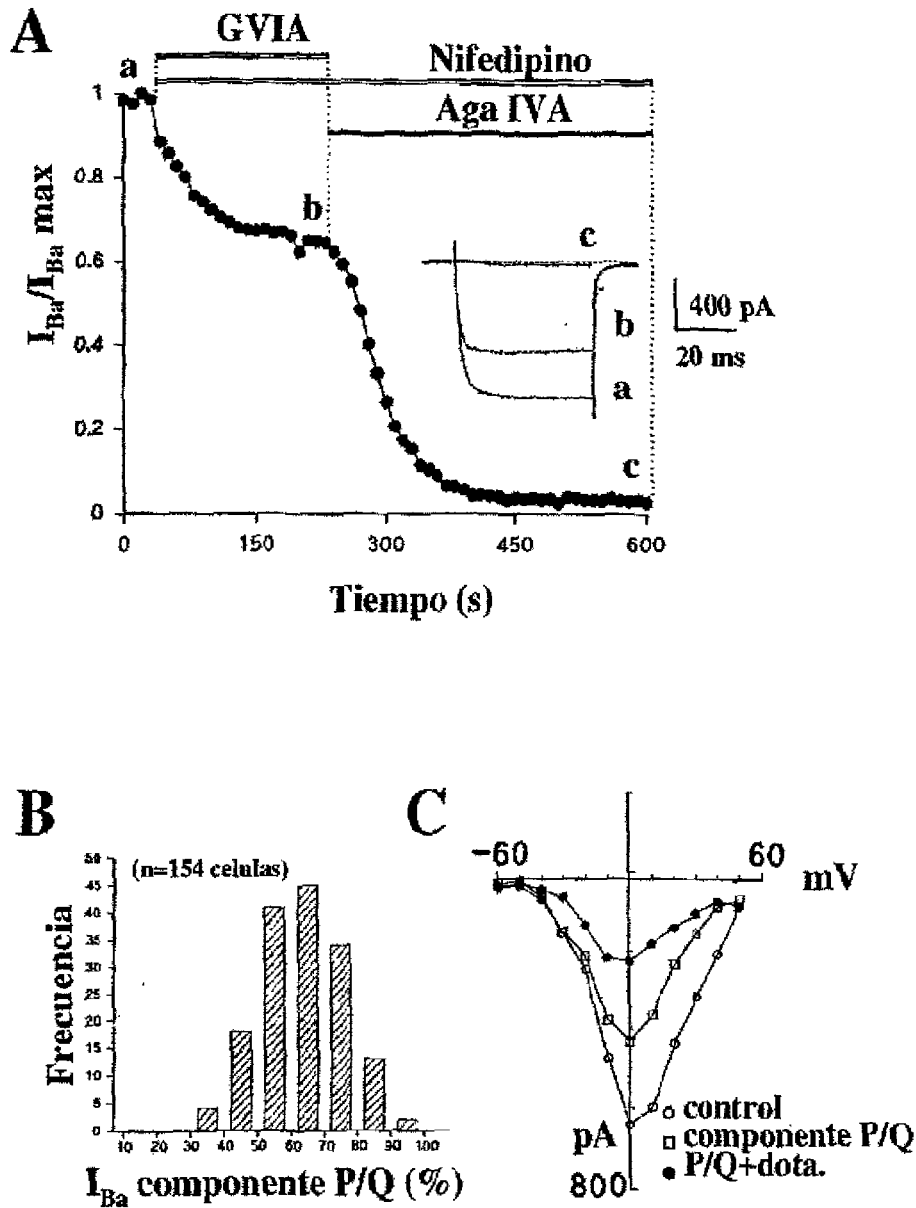


Figura 20.-Diseción farmacológica de las I_{Ba} a través de los canales P/Q en la célula cromafín bovina. En el panel A se muestra el curso temporal del bloqueo de la I_{Ba} cuando la célula se perfunde con una mezcla de ω -conotoxina GVIA (GVIA) y nifedipino, y seguidamente de ω -agatoxina IVA (aga IVA, en ausencia de GVIA), durante el período de tiempo y las concentraciones mostradas en las barras horizontales. Se representan las corrientes normalizadas ($I_{Ba}/I_{Ba\ max}$) frente al tiempo. Dentro de esta representación se muestran los trazados originales en distintos puntos a, b y c del curso temporal. El panel B muestra un histograma de distribución de frecuencias del número de células (ordenadas) que presentan el componente P/Q de la I_{Ba} (abscisas). En el panel C se muestra un experimento típico en el que se muestra la relación entre el voltaje y la corriente (curva I/V) en una célula cuyo V_m se fijó en -80 mV.

concentración de 10 mM. En estos experimentos, se fijó el V_m de las células cromafines en -80 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes de intensidad creciente (desde -60 mV hasta +80 mV). Como puede apreciarse en la figura 20C, el umbral de estimulación al que comienza a registrarse una corriente de Ca^{2+} se alcanzó a -40 mV, el pico máximo de corriente a 0 ó +10 mV y el potencial de reversión a +60 mV. Esto nos llevó a elegir el potencial test de +10 mV para realizar posteriormente los experimentos en los que se estudió el curso temporal de la I_{Ba} y su modificación por diversos fármacos y toxinas (nifedipino, 3 μ M; ω -conotoxina GVIA, 1 μ M; ω -agatoxina IVA, 1 μ M) que bloquean de forma selectiva determinados subtipos de canales de Ca^{2+} (ver tabla 2).

La figura 20A muestra un experimento típico en el que la superfusión de las células con una solución conteniendo una combinación nifedipino (3 μ M; un bloqueante de canales L) y ω -conotoxina GVIA (1 μ M; un bloqueante de canales N) produjo un bloqueo de la I_{Ba} de un 40%. El resto de la corriente (60%) se bloqueó al adicionar ω -agatoxina IVA (1 μ M) a la solución de perfusión, lo que confirma que este componente de corriente se corresponde a la entrada de Ba^{2+} a través de los canales P/Q. Los datos globales obtenidos muestran que el bloqueo de la corriente debida a los canales P/Q es de un 50% aproximadamente. Así, por medio de este protocolo pudimos aislar la corriente debida al componente P/Q de la debida a los subtipos L y N de los canales de Ca^{2+} .

La figura 20B muestra un histograma de distribución de frecuencias que nos indica la variabilidad observada en relación al componente P/Q de la corriente global de Ba^{2+} en células cromafines bovinas. Los datos globales nos indican que el componente sensible a ω -agatoxina IVA (canales P/Q) en este tipo celular es de un 60%. En el panel C de la figura 20 se representan las curvas I/V obtenidas en una célula cromafín bovina en condiciones control, tras la aplicación de una combinación de nifedipino+ ω -conotoxina GVIA (la corriente registrada corresponde al componente P/Q) y tras la aplicación de dotarizina (3 μ M) una vez disecado farmacológicamente los canales P/Q.

Una vez establecidas las condiciones que nos permiten aislar farmacológicamente los canales P/Q, éstas serán utilizadas en todos los experimentos desarrollados con dotarizina.

Así, los experimentos que se describen a continuación se hicieron después de tratar a las células con ω -conotoxina GVIA (que bloquea de forma irreversible los canales tipo N) y en presencia de nifedipino (al ser un bloqueante reversible de los canales tipo L).

2.2.-CINÉTICA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q

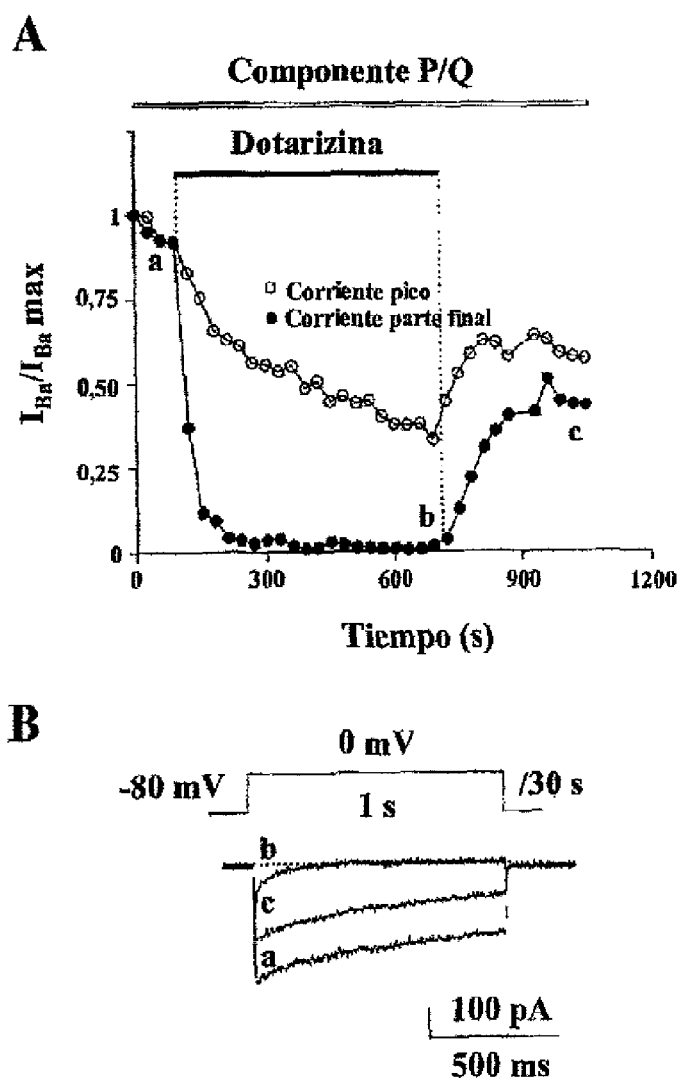


Figura 21.-La dotarizina bloquea e inactiva las I_{Ba} a través del canal P/Q. Para analizar el curso temporal del bloqueo por dotarizina se aplicaron pulsos despolarizantes de 1 s, desde -80 a 0 mV a intervalos de 30 s. Las células se trataron con ω -conotoxina GVIA y nifedipino como se muestra en la figura 20. En el panel A se representa el curso temporal de la corriente máxima (pico; círculos blancos) y de la última parte de la corriente (círculos negros); en el panel B se muestra una serie de registros originales correspondientes a la corriente control (a), tras la aplicación de dotarizina (b) y tras el lavado de la molécula (c).

Una vez aislado el componente P/Q de la I_{Ba} como se ha descrito en el apartado anterior, se perfundieron las células cromafines con una solución conteniendo dotarizina (10-30 μM) durante un periodo de 10 min con el fin de analizar la cinética del bloqueo producido por esta molécula. En estos experimentos se aplicaron pulsos despolarizantes a +10 mV, de 1 s de duración, a intervalos de 30 s. La superfusión de las células con dotarizina (10 y 30 μM), produjo un bloqueo gradual tanto el pico (corriente máxima) como la parte final de la I_{Ba} (figura 21). El máximo bloqueo por dotarizina (80% del pico y un 98% de la parte final de la curva) se alcanzó al cabo de 8 min de perfusión con dotarizina. Después de 10 min en presencia de dotarizina, se retiró ésta del medio extracelular con el fin de analizar la posible reversión del efecto bloqueante. En el experimento mostrado en la figura 21 puede observarse que tras el lavado de dotarizina, la I_{Ba} se recuperó parcialmente (80% de reversión del bloqueo del pico y 70% de recuperación en la parte final de la I_{Ba}).

2.3.-CONCENTRACIÓN-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q

En este apartado se estudia la posible concentración-dependencia del bloqueo por dotarizina de la I_{Ba} a través de los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q. No se pudieron realizar curvas concentración-respuesta acumulativas por ser la dotarizina un fármaco muy lipofílico que se acumula en las membranas plasmáticas y que va a ir bloqueando lenta y progresivamente los canales de Ca^{2+} , por lo que en estos experimentos se utilizó una sola concentración de dotarizina por célula.

Para la realización de estos experimentos se fijó el V_m de las células cromafines bovinas en -80 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes a +10 mV, de 50 ms de duración, a intervalos de 10 s. Como hemos comentado, la dotarizina bloqueó progresivamente la I_{Ba} , por lo que no se llegó a alcanzar un estado de equilibrio ante lo que decidimos valorar el grado de bloqueo producido por cada concentración de dotarizina después de 5 minutos de superfusión de las células con el fármaco.

En esta serie de experimentos (no mostrados) la dotarizina presentó una CI_{50} de 20 μM para el bloquear el pico de la corriente y una CI_{50} unas 10 veces inferior (2 μM) para bloquear

la parte final de la I_{Ba} . La concentración umbral a la cual se empezó a observar un bloqueo del pico de corriente fue de aproximadamente $3 \mu\text{M}$ ($0,3 \mu\text{M}$ en el caso de la parte final de la corriente). Curiosamente cuando se aplicaron concentraciones más elevadas de dotarizina el lavado de la molécula fue mayor.

2.4.-USO-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q

El marcado cambio cinético de la I_{Ba} observado durante la aplicación de dotarizina podría ser debido a varios mecanismos de acción, entre ellos un posible efecto uso-dependiente del bloqueo (se produce mayor bloqueo al estar mas tiempo abierto el canal), un posible efecto voltaje-dependiente (se produce mayor bloqueo al mantener la célula despolarizada durante el pulso) o un posible efecto de la dotarizina sobre las propiedades de inactivación de los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q.

Para estudiar si el efecto bloqueante de la dotarizina se relacionaba con el estado abierto del canal (efecto uso-dependiente), se realizaron experimentos modificando la frecuencia de estimulación de las células durante la superfusión con dotarizina. Para ello, se aplicaron pulsos despolarizantes de 10 ms de duración a distintos intervalos (5, 10 y 30 s) como se muestra en la figura 22.

Como se muestra en la figura 22, la dotarizina produjo un mayor bloqueo tanto de la corriente máxima como de la parte final de la I_{Ba} cuando las células fueron estimuladas a una mayor frecuencia (intervalo entre pulsos 5 s), tanto al cabo de 5 min de incubación como al cabo de 10 min. Estos datos indican que el bloqueo de la I_{Ba} a través de canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q muestra características de uso-dependencia, siendo mayor el bloqueo a mayor frecuencia de estimulación, lo que sugiere que la dotarizina parece unirse y bloquear mejor cuando el canal está en estado abierto.

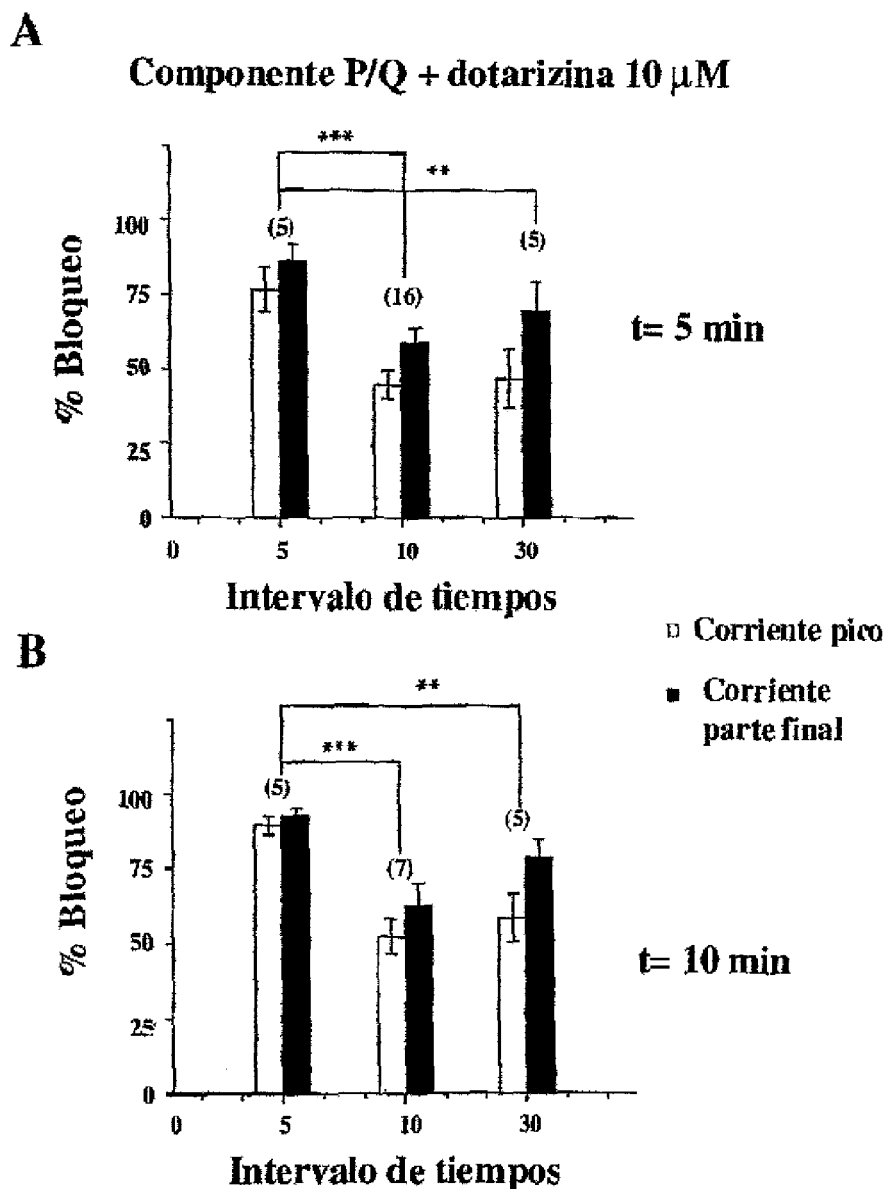


Figura 22.-El bloqueo de los canales P/Q por dotarizina depende de la frecuencia de estimulación. El V_m de las células se fijó en -80 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes a 0 mV, de 10 ms de duración, a intervalos de 5 , 10 y 30 s. Las células se trataron con ω -conotoxina GVIA más nifedipino. Las células se perfundieron con una solución extracelular conteniendo dotarizina (10μ M) durante 5 (panel A) ó 10 min (panel B). Los datos se representan como el % de bloqueo de la I_{Ba} por dotarizina a las distintas frecuencias de estimulación. Los datos son la media \pm e.m. del número de células indicado entre paréntesis. $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ son diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el test de la t de student comparando frecuencias de estimulación a distintos intervalos (10 y 30 s) frente a 5 s.

2.5.-VOLTAJE-DEPENDENCIA DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q

Como hemos comentado anteriormente, otro de los motivos que podría justificar el mayor grado de bloqueo producido por dotarizina al final del pulso en comparación con el bloqueo del pico de corriente podría ser el hecho de que la dotarizina mostrase características de voltaje-dependencia, con lo que el fármaco se uniría al canal y lo bloquearía mejor mientras la célula se encontrase en condiciones más despolarizadas (p.ej. durante el pulso despolarizante).

Para estudiar esta posible característica del bloqueo de la I_{Ba} a través de canales P/Q se realizó una serie de experimentos en los que se estudio el grado de bloqueo producido por la dotarizina cuando se modifica el V_m de las células. Así, se fijó este V_m a tres niveles: -110 mV (más hiperpolarizado), a -80 mV y a -60 mV (más despolarizado) y se aplicaron pulsos despolarizantes de 50 ms de duración desde cada V_m hasta 0 mV, a intervalos de 10 s.

La figura 23 muestra los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. Como puede apreciarse en el panel A, la superfusión de las células con dotarizina ($10 \mu\text{M}$) produjo un bloqueo gradual de la I_{Ba} , que fue mucho más pronunciado cuando las células se mantuvieron con un V_m más despolarizado (-60 mV) que cuando el V_m de las células se fijó en -80 mV. Por el contrario, cuando las células se mantuvieron en un estado más hiperpolarizado (-110 mV), el bloqueo por dotarizina fue significativamente más lento. El grado de bloqueo de la I_{Ba} , valorado al cabo de 10 min de superfusión con dotarizina, fue de tan solo un 20% a -110 mV, incrementándose hasta el 80% cuando el V_m de las células se fijó en -60 mV.

El panel A de la figura 23 también muestra registros originales de corriente obtenidos en las tres condiciones experimentales. Como puede observarse, el efecto "inactivante" de la dotarizina fue mucho más manifiesto cuando las células se mantuvieron con un V_m más hiperpolarizado.

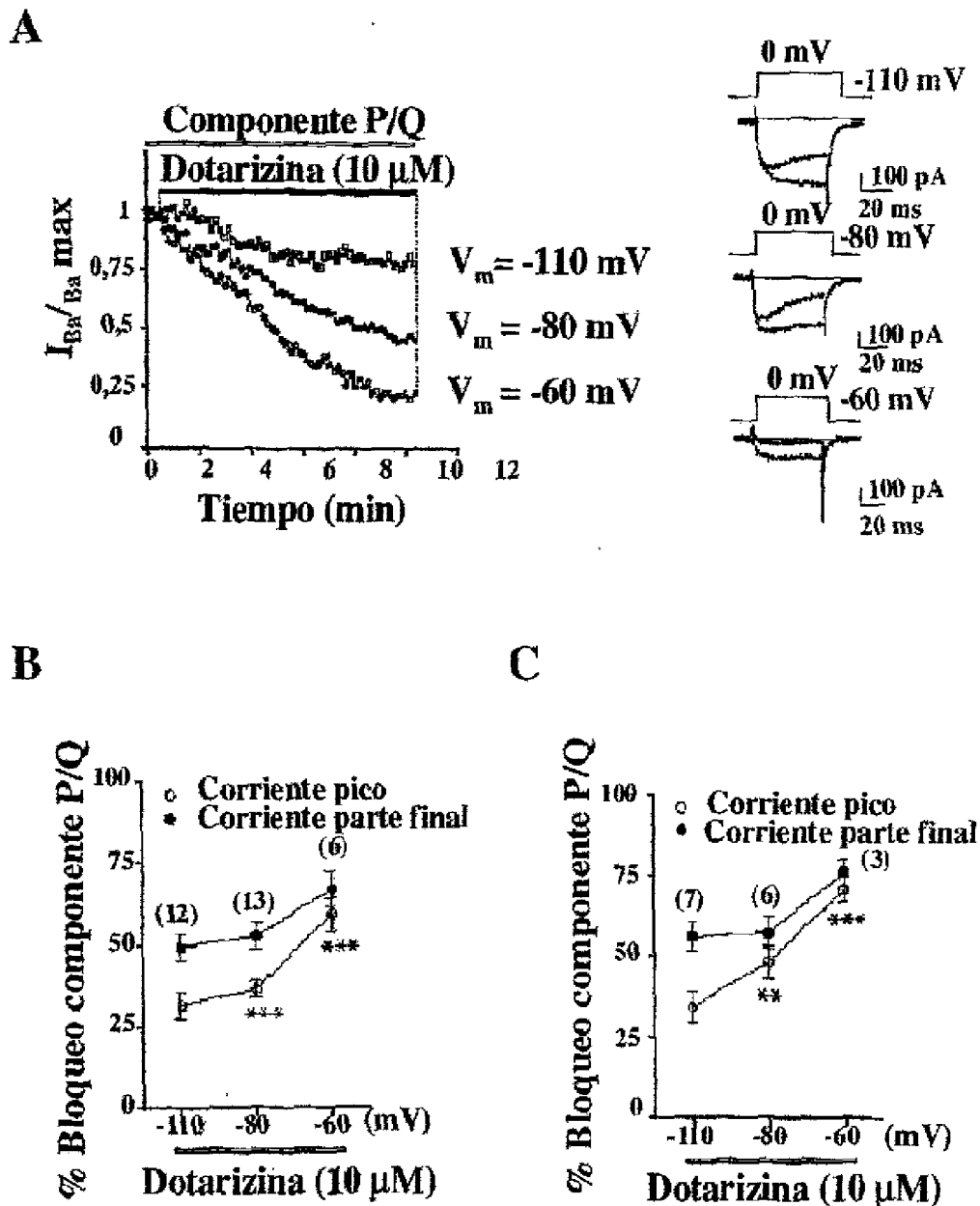
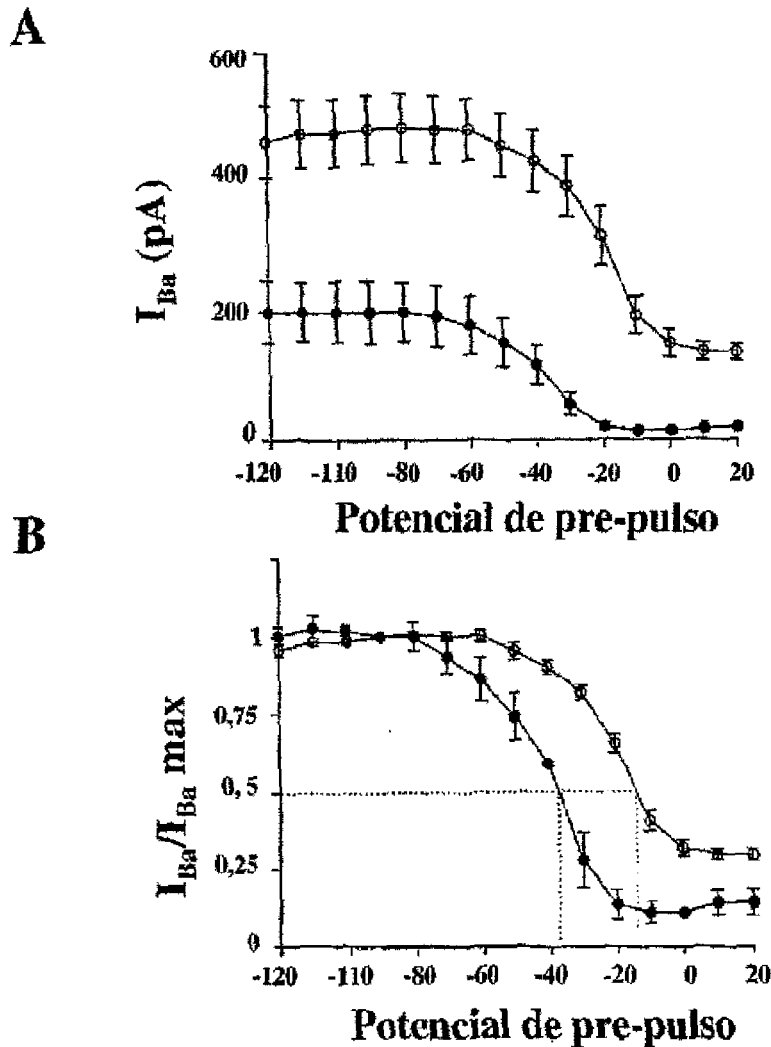


Figura 23.-Bloqueo del pico de corriente I_{Ba} a través del canal P/Q, a distintos HP. En estos experimentos se utiliza una única célula para cada V_m ; El V_m de las células se fijó en a -110 , -80 ó -60 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes a 0 mV, a intervalos de 10 s. La dotarizina ($10 \mu\text{M}$) se aplicó durante 10 min en todos los casos (barra superior horizontal). El panel A presenta el curso temporal del efecto bloqueante de dotarizina sobre la I_{Ba} en tres células cromafines bovinas cuyo V_m se fijó al nivel indicado en la figura; en la parte derecha se representan registros originales de corriente obtenidos en cada situación. En el panel B se muestran los datos medios de bloqueo por dotarizina sobre la corriente del pico y sobre la parte final de la corriente a los V_m estudiados, cuando la dotarizina se incubaba durante 5 min. En el panel C se muestra lo mismo que en el panel B, pero cuando la dotarizina se incubaba durante 10 min. Los datos corresponden a la mediana e.m. del número de células indicado entre paréntesis. $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ son diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el test de la t de student comparando -80 y -60 mV frente a -110 mV de V_m fijado.

2.6.-EFECTOS DE DOTARIZINA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEL SUBTIPO P/Q



Distribución de Boltzman: $I = I_{max} / (1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/K])$

- Componente P/Q $V_{1/2} = -20,400,9144$ mV (n=7)
- Componente P/Q+Dotarizina $V_{1/2} = -41,2411,182$ mV (n=6)

Figura 24.-La dotarizina favorece la inactivación de los canales P/Q. Se realizaron curvas de inactivación en ausencia y presencia de dotarizina (10 μ M). En estos experimentos se fijó el V_m de la célula en -80 mV y se aplicaron pre-pulsos despolarizantes de 2s de duración, a los diferentes voltajes indicados en la abscisa (desde -120 hasta 20 mV, con incrementos de 10 mV), seguido de un pulso test a 0 mV, de 50 ms de duración, a intervalos de 30 ms. En el panel A se muestra la curva de inactivación, los círculos blancos son el control y los círculos negros en presencia de dotarizina. El panel B muestra la curva de inactivación normalizada.

La tercera razón que podría justificar los cambios cinéticos de la I_{Ba} registrada durante la perfusión con dotarizina es que este fármaco actuase favoreciendo la inactivación de los canales P/Q. Para explorar esta posibilidad se realizaron experimentos utilizando protocolos típicos de inactivación de corrientes de Ca^{2+} que se aplicaron en ausencia y en presencia de dotarizina (10 μ M). Brevemente, estos protocolos consistieron en la aplicación, a células cromafines bovinas cuyo V_m se había fijado en -80 mV, de pulsos despolarizantes de 1-2 s de duración, de intensidad progresivamente creciente (con incrementos de 10 mV), seguidos de un pulso test a un potencial de 0 ó +10 mV.

La figura 24 muestra un experimento típico de curva de inactivación de los canales P/Q. Como puede observarse, en condiciones control la I_{Ba} decae progresivamente al incrementar la intensidad del pre-pulso despolarizante, mostrando un $V_{1/2}$ de aproximadamente -20 mV. Al superfundir las células con dotarizina (10 μ M) se produjo un notable bloqueo de la I_{Ba} (figura 24A), que se acompañó de un significativo desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales más hiperpolarizados. Así, en presencia de dotarizina, la curva de inactivación de los canales P/Q mostró un $V_{1/2}$ de aproximadamente -41 mV, lo que indica que el tratamiento de las células con dotarizina favorece la inactivación de los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q.

3.-ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Como se ha comentado previamente en varios apartados de la Introducción, la teoría neurogénica o neurovascular sobre la etiopatogenia de la migraña postula que la liberación exocitótica de determinados péptidos vasoactivos podría estar implicada en la génesis de la crisis migrañosa. También hemos comentado que los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q pueden estar implicados en la liberación de neurotransmisores en determinadas preparaciones neuronales. Con estas premisas, nos pareció interesante comprobar si la dotarizina, que se ha mostrado como un bloqueante de canales P/Q como hemos visto en el apartado anterior, era capaz de modular o bloquear la liberación de neurotransmisores. Para ello hemos elegido dos modelos experimentales diferentes: por un lado hemos estudiado la liberación de catecolaminas estimulada mediante la aplicación de soluciones despolarizantes en células cromafines bovinas, un proceso en el que está altamente implicada la entrada de Ca^{2+} al citosol a través de canales tipo L y canales de tipo P/Q, y, en segundo lugar, hemos estudiado

la liberación de [^3H]-NA desde neuronas simpáticas, un proceso en el que también parecen intervenir los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q.

3.1.-SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

La liberación de catecolaminas por células cromafines bovinas se estudió mediante técnicas de registro amperométrico (Borges y col., 1986). Brevemente, las células (5 millones) se colocaban en una pequeña cámara y se perfundían continuamente con una solución Krebs-HEPES en ausencia de Ca^{2+} (0Ca^{2+} nominal) y en presencia de concentraciones distintas de K^+ con el objetivo de mantener distinto grado de despolarización de las células.

Tras un periodo de estabilización (habitualmente 1 h), las células se estimularon de forma intermitente, a intervalos de 2 min, mediante la aplicación de pulsos breves (2 s) de una solución de K^+ (100 mM, con reducción isosmótica del Na^+) que contenía 2 mM de Ca^{2+} ($100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$). La figura 25 muestra dos registros típicos obtenidos en dos experimentos realizados en células cromafines bovinas incubadas en presencia de 5,9 mM de K^+ (panel A) o de 17,7 mM de K^+ (panel B), y el bloqueo producido por la dotarizina en ambos casos.

Estos resultados indicaban que la dotarizina era capaz de bloquear la secreción de catecolaminas mediada por la entrada de Ca^{2+} del subtipo P/Q mostrando además características de voltaje-dependencia, de forma similar a lo observado en los registros electrofisiológicos, siendo mayor el grado de bloqueo observado cuando las células se mantuvieron en un estado ligeramente despolarizado mediante su incubación en presencia de 17,7 mM de K^+ .

Para comprobar esta propiedad de voltaje-dependencia en el bloqueo de la liberación de neurotransmisores, se repitió este tipo de experimentos pero perfundiendo las células con soluciones de Krebs-Hepes con distintas concentraciones de K^+ (1,2 K^+ ; 5,9 K^+ ; 17,7 K^+ ; 35 K^+ ; 59 K^+ y 70 K^+), estimulando la secreción con una solución de Krebs-Hepes que contenía 100 mM de K^+ y 2 mM de Ca^{2+} ($100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$). Como puede apreciarse en la figura 26, el grado de bloqueo de la secreción por dotarizina fue incrementándose progresivamente a medida que se incrementaba el K^+ en la solución en la que fueron incubadas las células.

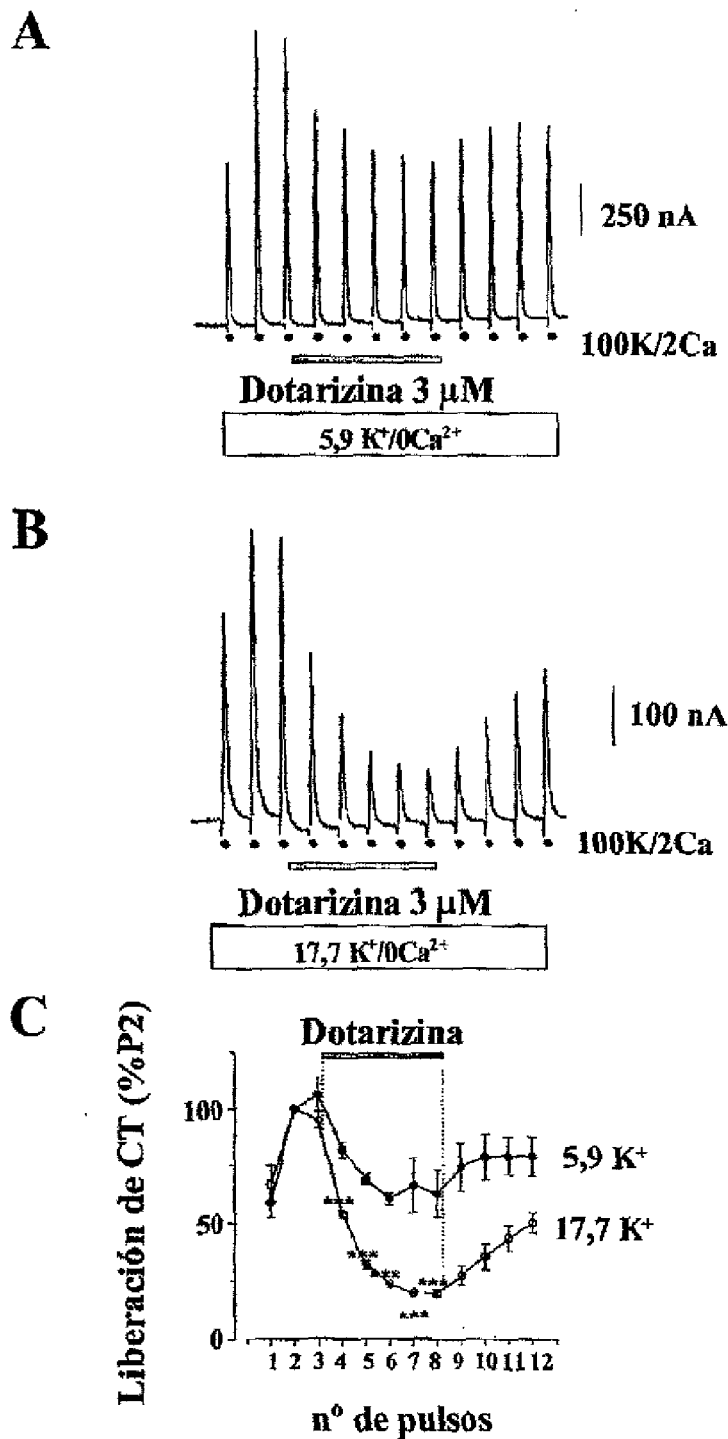


Figura 25.-Bloqueo por dotarizina de la secreción de catecolaminas inducida por soluciones despolarizantes en células cromafines bovinas. Los paneles A y B muestran los picos de secreción originales obtenidos en dos tipos de experimentos. En el panel A, las células se perfunden continuamente con una solución que contiene 5,9 mM de K⁺ (5,9K⁺/0Ca²⁺) y en el panel B, las células se perfunden continuamente con una solución que contiene K⁺ 17,7 mM (17,7K⁺/0Ca²⁺). Los puntos negros indican la estimulación de la secreción de catecolaminas con 100K⁺/2Ca²⁺. La dotarizina se administró durante 10 min (barra horizontal negra). El panel C muestra las mediantes.e.m. de 5 experimentos en todos los casos ***p \leq 0,001 son diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el test de la t de student con respecto al bloqueo observado en células superfundidas con 5,9K⁺/0Ca²⁺.

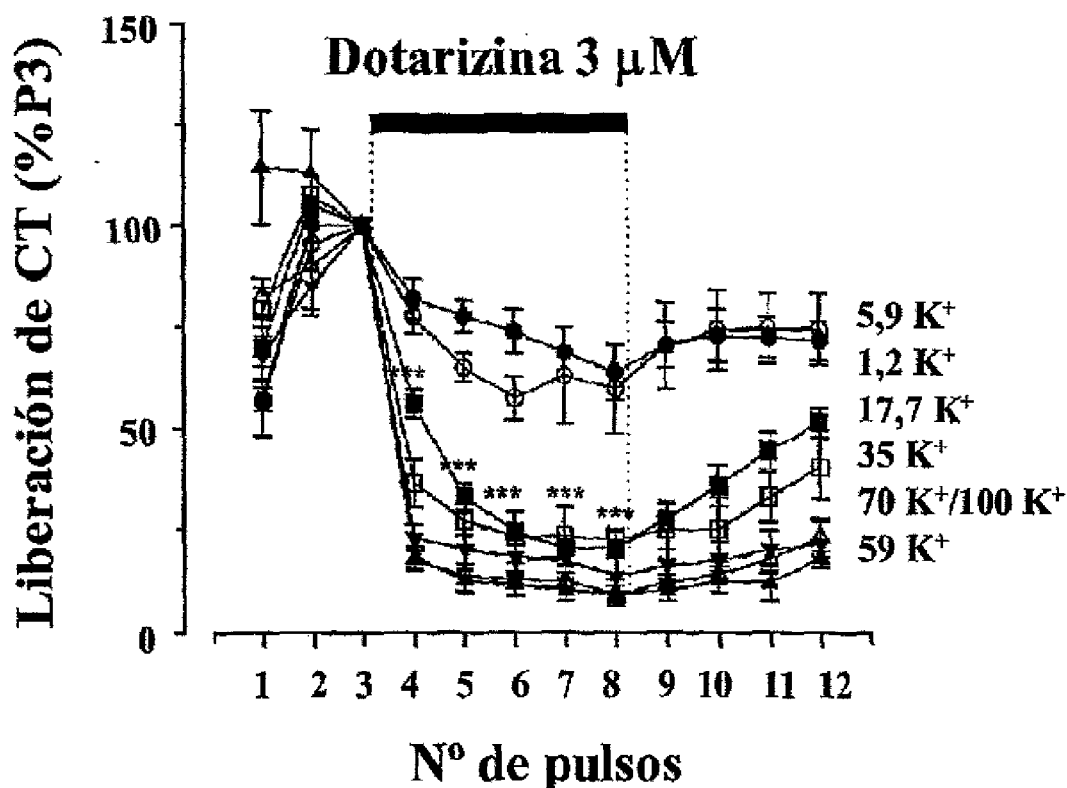


Figura 26.—El grado de bloqueo de la secreción de catecolaminas por dotarizina depende de la concentración extracelular de K^+ . La figura muestra la media de los resultados obtenidos en experimentos realizados en el protocolo de la figura 24, incubando las células en presencia de diversas concentraciones de K^+ como se indica. La dotarizina ($3 \mu M$) se perfundió desde 5 min antes del 4º pulso despolarizante ($100K^+/2Ca^{2+}$) y durante el tiempo indicado por la barra horizontal. Los datos se expresan como el % de bloqueo de la secreción respecto al 3º pulso en cada experimento individual y corresponden a la media \pm e.m. de 5 experimentos en todos los casos. *** $p \leq 0,001$ son diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el test de la t de student con respecto a los valores obtenidos con $5,9K^+/0Ca^{2+}$ y $1,29K^+/0Ca^{2+}$.

3.2-LIBERACIÓN DE NORADRENALINA TRITIADA EN NEURONAS SIMPÁTICAS

El posible efecto bloqueante de la dotarizina sobre la liberación de neurotransmisores también se midió midiendo la liberación de [3H]-NA de neuronas simpáticas. Para ello, se estimularon las neuronas simpáticas mediante la aplicación de una solución despolarizante (70

mM K^+ /2 mM Ca^{2+}) durante 1 min, pudiéndose repetir la estimulación de las células a intervalos de 15 min.

Para estudiar el efecto bloqueante de dotarizina y flunarizina sobre la liberación de [3H]-NA, ambos fármacos se incubaron durante 10 min antes de la estimulación con K^+ . La liberación basal (previa a la estimulación) fue 780 ± 46 cpm ($n=39$) y la liberación inducida por K^+ de 5022 ± 574 cpm ($n=13$). Como se muestra en la figura 27, tanto la dotarizina como la flunarizina bloquearon la liberación de [3H]-NA de las neuronas simpáticas de forma concentración-dependiente, con una CI_{50} de $6,9 \mu M$ y $2,8 \mu M$ para dotarizina y flunarizina, respectivamente.

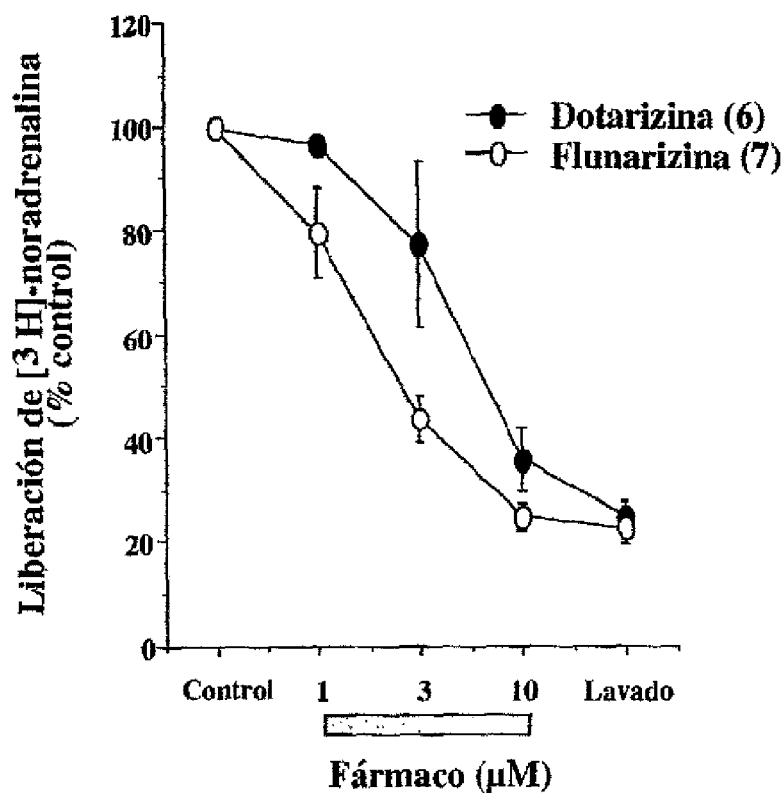


Figura 27.-Efecto del bloqueo de la liberación de [3H]-noradrenalina en neuronas simpáticas de rata. Las neuronas se estimularon con K^+ 70 mM durante 1 min. Los fármacos se preincubaron durante 10 min antes de inducir la liberación de [3H]-NA con la solución despolarizante. Los datos se expresan como el porcentaje de la liberación neta inducida por K^+ en ausencia del fármaco y corresponden a la media \pm e.e.m. para 7 y 6 experimentos con dotarizina y flunarizina, respectivamente.

DISCUSIÓN

1.-ESTUDIO DE REACTIVIDAD VASCULAR

En esta primera parte de la Tesis se estudian los distintos mecanismos por los cuales la dotarizina modula la contractilidad vascular. Así, en primer lugar se estudió las posibles diferencias entre los vasos de gran capacitancia (arterias aorta y femoral) y los de resistencia o microvasos (arterias vertebral y 4ª rama de la mesentérica).

1.1.-EFECTO ANTISEROTONINÉRGICO DE LA DOTARIZINA

Se sabe por la bibliografía, que la dotarizina es un bloqueante de los receptores de serotonina del subtipo 5-HT₂ (Brasó y col., 1996; Montiel y col., 1997). De aquí que la dotarizina muestre un buen bloqueo de la contracción vascular inducida por serotonina en los cuatro vasos estudiados (CI₅₀5 alrededor de 1µM). Es interesante destacar que la flunarizina, aunque no presenta propiedades bloqueantes del receptor de 5-HT (Montiel y col., 1997), produjo un bloqueo de la contracción en los vasos de resistencia, pero no en los de gran capacitancia. Esta diferencia es explicable porque la contracción inducida por diversos agonistas vasoconstrictores en vasos de gran capacitancia se debe fundamentalmente a la movilización del calcio desde depósitos intracelulares; y así, aunque estas arterias expresan los canales de calcio del subtipo L (Godfraind, 1989) éstos no son reclutados porque los diversos agonistas que inducen la contracción vascular no producen la despolarización de las fibras musculares lisas necesaria para la apertura de estos canales (Cauvin y Van Breemen, 1985). Por el contrario, las arterias de resistencia se contraen por agentes que reclutan los canales de calcio del subtipo L, favoreciendo así la entrada de calcio en las células musculares lisas (Benham y Tsien, 1984). Esto explicaría por qué la contracción inducida con noradrenalina en la aorta de conejo, es resistente al bloqueo de los canales de calcio del subtipo L como diltiazem y por qué, en cambio, este fármaco bloquea la contracción en los vasos de resistencia como las arterias mesentéricas (Cauvin y Van Breemen, 1984; Tejerina y col., 1992). Esto también podría explicar, por qué la flunarizina, bloqueante de los canales de calcio del subtipo L vascular, pero no de los receptores de 5-HT (Montiel y col., 1997), no bloquea la contracción inducida por 5-HT en la arteria aorta (figura 12A) y en la arteria femoral de conejo (figura 12B), mientras que sí bloquea la contracción de la 4ª rama de la arteria mesentérica (figura 12D) y la arteria vertebral (figura 12C).

Otro problema que se ha planteado en esta Tesis ha sido estudiar la posible selectividad de la dotarizina por un determinado receptor. Así, se ha observado que la dotarizina no es capaz de bloquear la contracción inducida por la activación del receptor α -adrenérgico, o la contracción inducida por la adición de Ag II o de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (figura 14). Al igual que la ketanserina, la dotarizina parece bloquear de forma bastante selectiva el receptor de serotonina (5-HT_2), si bien es de destacar que la CI_{50} de la dotarizina para el bloqueo de la contracción de la arteria aorta, femoral y vertebral estimulada por 5-HT fue unas 7-8 veces superior que la de ketanserina; y unas 30 veces superior en el caso de la 4ª rama de la arteria mesentérica (tabla 7). Estos datos sugieren que tanto la dotarizina como la ketanserina podrían actuar bloqueando distintos subtipos de receptores para serotonina en los diferentes lechos arteriales estudiados. De hecho, se ha descrito la existencia de distintos subtipos de receptores de 5-HT que median la contracción en distintos lechos vasculares (Parsons, 1991).

Con respecto a este efecto antiserotoninérgico de la dotarizina, resulta interesante destacar el hecho de que, al contrario de lo que ocurre con la ketanserina, el efecto bloqueante de la dotarizina sobre la contracción inducida por 5-HT es de tipo no competitivo. También es destacable el hecho de que, a concentraciones submicromolares, la dotarizina incrementa ligeramente la contracción máxima evocada por 5-HT, lo que indica la existencia de una interacción compleja de la dotarizina con los receptores de 5-HT, y /o una interacción con algún otro subtipo de receptor, dependiendo de su concentración y del tipo de lecho vascular. Debido a que los receptores de serotonina 5-HT_{2B} se han visto también implicados en la fisiopatología de la migraña (Schmuck y col., 1996; Johnson y col., 1998), estamos intentando expresarlos en ovocitos, en nuestro laboratorio, para ver si la dotarizina se une a ellos.

1.2.-EFECTO CALCIO-ANTAGONISTA DE LA DOTARIZINA

Por otro lado, como ya hemos comentado, el mecanismo vasodilatador de la dotarizina posee un segundo componente, como es el bloqueo de los canales de calcio voltaje-dependientes (figuras 14A y 18B; también ver Tejerina y col., 1993; Villarroja y col., 1995; Montiel y col., 1997). A nivel vascular, el canal de calcio del subtipo L es el responsable de la contracción debida a la despolarización de los vasos, siendo el nifedipino el prototipo de antagonista de calcio, de naturaleza dihidropiridínica (Fleckenstein-Grun y Fleckenstein, 1990). En esta tesis se corrobora la voltaje-dependencia del bloqueo de los canales de calcio del subtipo L por nifedipino, como se describió en experimentos realizados por Nelson y

Worley (1989) con nisoldipino (otra DHP) en la arteria mesentérica de conejo. En contraste con lo que ocurre con estos fármacos del grupo de las DHPs, con la dotarizina, no se observó esta voltaje-dependencia para bloquear la contracción evocada por la aplicación de soluciones despolarizantes (figura 18B).

De todas formas, en esta serie de experimentos se ha observado una diferencia interesante entre la dotarizina y la flunarizina. Después del lavado, en el caso de la dotarizina, los vasos tendieron a recuperar lentamente su contracción inicial, mientras que en los vasos tratados con flunarizina, el bloqueo de la contracción fue progresivamente mayor tras el lavado (efecto post-fármaco). Estos datos concuerdan con experimentos anteriores de mi grupo de investigación, donde se observaba que la flunarizina tenía una tendencia clara a acumularse en las células cromafines bovinas (Lara y col., 1997); y como consecuencia la mostraba mayor efecto citotóxico que la dotarizina (Novalbos y col., 1999a).

El bloqueo por dotarizina de la contracción evocada por K^+ en los vasos cerebrales es dependiente de la concentración de Ca^{2+} del medio, de acuerdo con el concepto de calcio-antagonista desarrollado por Fleckenstein-Grun y Fleckenstein (1990) para verapamilo, diltiazem y los derivados de 1,4-dihidropiridinas. De aquí que, a bajas concentraciones de dotarizina (1 μM), el exceso de calcio sea capaz de competir y revertir el bloqueo ejercido por la dotarizina en la contracción de la arteria cerebral media. Sin embargo, a una concentración un poco superior de dotarizina (3 μM), el calcio ya no puede revertir el bloqueo ejercido por ésta (figura 19). Estos experimentos también muestran cómo la dotarizina bloquea los canales de calcio del subtipo L, previniendo la contracción inducida por K^+ de los vasos cerebrales.

1.3.-BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

El último efecto de la dotarizina que se ha estudiado en este apartado de reactividad vascular, es el bloqueo de la contracción evocada por estimulación eléctrica de campo, efecto compartido en menor medida, con la flunarizina (figura 15).

La respuesta contráctil en respuesta a la estimulación eléctrica es mediada por la NA liberada de las terminaciones nerviosas simpáticas que inervan los vasos cerebrales. Se sabe que la liberación de la NA es controlada por el calcio que entra a través de los CCVD del

subtipo N (Lipscombe y col., 1989; Vega y col., 1995; Hirata y col., 1997), y que la dotarizina bloquea las corrientes de calcio debidas a éste y otros subtipos de canales de calcio neuronales, en experimentos de electrofisiología con la técnica de "patch-clamp" en la configuración de célula entera (Villarroya y col., 1995).

Los experimentos realizados en neuronas simpáticas muestran de forma más contundente que la dotarizina bloquea la liberación de NA. Así, la CI_{50} de bloqueo de la liberación de la [3H]-NA es de 6,9 μM (figura 27), una concentración similar a la que produce un bloqueo del 50% de la contracción inducida por estimulación eléctrica, en las arterias cerebrales medias bovinas (figura 15). Se cree que la inervación simpática de los vasos cerebrales proviene de fibras nerviosas del ganglio cervical superior. Si esto es así, el tono simpático modularía la contractilidad de los vasos cerebrales y la dotarizina reduciría ese control, mediando la vasodilatación. De hecho, en experimentos realizados "*in vivo*", utilizando la sonografía transcraneal de Doppler, la dotarizina abolió la vasoconstricción cerebral provocada por la hiperventilación en gatos (Czernicki y col., 1996) y en conejos (Kuridze y col., 2000), favoreciendo la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo cerebral.

Se ha visto que en la patogenia de la migraña existe un fallo en la regulación del flujo sanguíneo cerebral; esto ha sido demostrado en pacientes migrañosos por medio de la técnica de ultrasonidos intracraneales de Doppler (Silvestrini y col., 1995). También, se ha visto que durante los períodos sin migraña, los pacientes tienen una respuesta vasodilatadora disminuida en respuesta a una hipercapnia de las arteriolas cerebrales (Totaro y col., 1997). Durante estos intervalos, la dotarizina, tendría una acción estabilizadora en los vasos sanguíneos por interferir presinápticamente limitando la respuesta simpática en los lechos sanguíneos cerebrales, y postsinápticamente, modulando el efecto vasoconstrictor de los receptores de 5-HT tanto en los vasos de gran capacitancia como de resistencia, así como el calcio que entra a través de los canales de calcio voltaje-dependientes del subtipo L en los microvasos. Este triple mecanismo podría explicar el efecto de la dotarizina en la profilaxis de la migraña, que ya ha sido mostrado en varios ensayos clínicos (Horga y col., 1994).

2.-ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las células cromafines de la médula suprarrenal bovina constituye un excelente modelo para el estudio de los efectos bloqueantes de dotarizina sobre diferentes subtipos de canales de calcio voltaje-dependientes. Estas células expresan CCVD de los subtipos L, N y P/Q (López y col., 1994; Albillos y col., 1996). En estas células, la corriente de Ca^{2+} a través de los canales P/Q, en configuración de célula entera es del 50-60% (Albillos y col., 1996; Gandía y col., 1997).

Para el estudio selectivo de los efectos de la dotarizina sobre los canales P/Q, las corrientes de Ca^{2+} de entrada a través de los canales de los subtipos L y N, se bloquearon mediante el uso de nifedipino (un bloqueante selectivo de los canales Ca^{2+} de del subtipo L) y ω -conotoxina GVIA (bloqueante selectivo del subtipo N) (Olivera y col., 1994). La identidad "farmacológica" del componente de corriente resistente al bloqueo por la combinación de nifedipino + ω -conotoxina GVIA se corroboró mediante su bloqueo completo tras la adición de ω -agatoxina IVA (un bloqueante de canales P/Q). La dotarizina y la ω -agatoxina IVA bloquean la misma fracción de corriente de entrada de calcio a través de los canales de Ca^{2+} en configuración de célula entera (figura 20). Esto sugiere que la dotarizina, al igual que la ω -agatoxina IVA, bloquea los canales P/Q de las células cromafines. Pero el mecanismo de bloqueo varía mucho entre los dos componentes. Así, la ω -agatoxina IVA, contrario a lo que sucede con la dotarizina, bloquea la corriente debida a los canales P/Q de forma paralela y sin promover su inactivación (figura 20); ésto ocurre con pulso cortos y largos (experimentos no mostrados).

2.1.-CARACTERÍSTICAS DEL BLOQUEO POR DOTARIZINA DE LOS CANALES P/Q

En esta serie de experimentos se comprobó que el efecto bloqueante de dotarizina del componente P/Q en las células cromafines bovinas es concentración- y tiempo-dependiente (figura 20A). La alta lipofilidad del compuesto (Lara y col., 1997) podría explicar el lento acceso al canal de Ca^{2+} P/Q en la membrana plasmática. Debido a su elevada lipofilidad, la dotarizina podría atravesar fácilmente la bicapa lipídica y permanecer unos pocos segundos acumulada en la membrana plasmática. Así, la lentitud del bloqueo de la corriente, se debe

estudiar en la cinética del propio canal de calcio, que requiere una conformación determinada para permitir el acceso y la unión de la dotarizina a su receptor, el canal de Ca^{2+} del subtipo P/Q. Sugiriendo estos datos que la dotarizina podría actuar sobre el canal de Ca^{2+} P/Q en su estado abierto.

El marcado cambio cinético de la I_{Ba} observado durante la aplicación de dotarizina podría ser debido a varios mecanismos de acción, entre ellos un posible efecto uso-dependiente del bloqueo (se produce mayor bloqueo al estar más tiempo abierto el canal), un posible efecto voltaje-dependiente (se produce mayor bloqueo al mantener la célula despolarizada durante el pulso) o un posible efecto sobre las propiedades de inactivación de los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q.

Así, por ejemplo, cuando la duración del pulso test despolarizante fue mayor, el bloqueo de la última parte de la corriente fue más pronunciado. Es interesante ver, cómo la dotarizina bloqueó igualmente el pico de la I_{Ba} , tanto en respuesta a pulsos despolarizantes cortos (15, 50 ms) como a pulsos largos (500, 1000 ms); mientras que la última parte de I_{Ba} se bloqueó más a pulsos despolarizantes largos (datos no mostrados). Esto se puede interpretar de la siguiente manera. Al principio, en un pulso largo todos los canales están abiertos, así, la dotarizina se une a su receptor, cerrando los canales gradualmente y promoviendo la inactivación de la corriente. Con pulsos muy cortos, la dotarizina no tiene tiempo suficiente para actuar. Cuanto mayor es la duración del pulso, mayor es la unión del compuesto a los canales abiertos y mayor el bloqueo. Esto explica, el porqué la dotarizina bloquea más drásticamente en la última parte de la I_{Ba} en vez del pico de I_{Ba} ; y porqué la dotarizina muestra un bloqueo mayor de I_{Ba} a frecuencias más rápidas de estimulación (figura 22): cuanto mayor es la frecuencia, mayor es el tiempo en que el canal P/Q está abierto y la dotarizina accede a su receptor mejor.

Otra característica interesante de la dotarizina, es la voltaje-dependencia del bloqueo. Se observa un bloqueo mayor, a V_m más despolarizados (-60 mV) con respecto a potenciales más hiperpolarizados (-80, -100 mV) (figura 23), lo que sugiere que la dotarizina se une mejor a su receptor cuando la membrana está más despolarizada y por tanto un mayor número de canales se encuentra en estado abierto. Finalmente, también, parece que la dotarizina favorece el estado inactivado de los canales P/Q, por el marcado desplazamiento de las curvas de inactivación hacia la izquierda (25 mV) (figura 24).

2.2-CANALES P/Q Y LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q se han implicado en el control de la secreción de neurotransmisores en distintas áreas cerebrales (Luebke y col., 1993; Mintz y col., 1992). Por ello consideramos interesante estudiar si el mecanismo de bloqueo de la dotarizina sobre los canales P/Q, contribuía de forma relevante en el control de la neurosecreción. Se utilizaron concentraciones de dotarizina que bloqueaban los canales P/Q y se observó que la dotarizina inhibía la liberación de catecolaminas estimulada por pulsos cortos de K^+ . Como la señal secretora es debida a los canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q (López y col., 1994), parece que el efecto bloqueante de la dotarizina en la secreción de catecolaminas es debido, en parte, a la activación de los canales P/Q. Además, este bloqueo de la secreción por dotarizina, fue mayor cuando las células estaban despolarizadas. Esto podría tener implicaciones terapéuticas y fisiopatológicas en el uso potencial de dotarizina en pacientes con dolores migrañosos crónicos.

3.-PAPEL DE LA DOTARIZINA EN EL TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA

La dotarizina es un fármaco con acción antiserotoninérgica 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} , acción calcio-antagonista de amplio-espectro y acción antihistamínica que se quiere posicionar en la clínica como preventivo de la crisis migrañosa. La profilaxis de la migraña, más que el tratamiento de la crisis, es un objetivo clínico prioritario, es las horas de trabajo que se ahorrarán y sobre todo, es la mejoría de la calidad de vida de los pacientes. En la profilaxis de la migraña se han utilizado calcio-antagonistas tipo verapamilo y flunarizina. Sin embargo sus efectos colaterales vasculares y neurológicos limitan su utilidad. En relación con esto, los estudios desarrollados indican que la dotarizina, derivado piperazínico químicamente relacionado con la flunarizina, es un fármaco más favorable que ésta debido a los siguientes hallazgos:

1. La mayoría de las acciones estudiadas con dotarizina son reversibles y no presentan post-efecto como la flunarizina. Esto significa que la dotarizina tiene menos capacidad de acumulación en membranas celulares y por tanto presentaría menos efectos secundarios, entre ellos los centrales.

2. Se necesitan concentraciones más elevadas de dotarizina que de flunarizina para inducir toxicidad celular, valorada como liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular en cultivos celulares.
3. La dotarizina mostró acción antiserotoninérgica en todos los lechos vasculares estudiados (aorta, femoral, mesentérica y vertebral) mientras que la flunarizina sólo fue activa en la arteria mesentérica.

Por otro lado, debemos recordar que en la fisiopatología de la migraña se implican factores vasculares (Lance, 1981; Wolf, 1987) y neurogénicos (Moskowitz, 1992; Moskowitz, y Macfarlane, 1993). En este sentido, la liberación de neuropéptidos vasoactivos de las fibras nerviosas trigeminales, parece ser un punto importante a tener en cuenta durante la crisis migrañosa. Si la liberación de neuropéptidos vasoactivos es controlada por el Ca^{2+} que entra a través de los CCVD del subtipo P/Q, entonces cabe esperar que bloqueándolos con dotarizina se prevenga la neurosecreción y con ello el ataque migrañoso. Se ha descrito una isquemia cerebral focal que precede al ataque de migraña (Lauritzen, 1994; Lauritzen y col., 1983; Welch y col., 1995). Esta situación podría favorecer la despolarización del tejido neuronal, lo que favorecería la unión de la dotarizina a su receptor, facilitándose el bloqueo voltaje-dependiente de la dotarizina sobre los canales P/Q abiertos.

CONCLUSIONES

1.-EFECTO DE DOTARIZINA A NIVEL VASCULAR

- La dotarizina bloquea de forma selectiva la contracción evocada por 5-HT en distintos lechos vasculares tanto a nivel periférico como cerebral mediante un mecanismo dual: bloqueo serotoninérgico y bloqueo de canales de calcio.
- La dotarizina bloquea en forma no competitiva los receptores 5-HT.
- El efecto calcio-antagonista de la dotarizina no muestra propiedades de voltaje-dependencia.
- La dotarizina bloquea la contracción evocada por estimulación eléctrica de campo, probablemente por bloquear la liberación de NA desde terminaciones nerviosas.

2.-EFECTO DE DOTARIZINA SOBRE CANALES DE CALCIO P/Q

- La dotarizina bloquea las corrientes globales de Ca^{2+} en forma concentración-, voltaje- y uso-dependiente.
- La dotarizina favorece la inactivación del canal P/Q

3.-EFECTO SOBRE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

- La dotarizina bloquea la liberación de [3H]NA en neuronas simpáticas de rata.
- Bloquea la secreción de catecolaminas de células cromafines bovinas.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUT, J., SACRISTÁN, A. and ORTIZ, J.A. (1990) Dotarizine on 5-HT₂ receptor binding in rat frontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **183**, 2147.
- ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G., OLIVERA, B. and GANDÍA, L. (1996) Re-evaluation of the P/Q Ca²⁺ channel components of Ba²⁺ currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba²⁺ concentrations. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **432**, 1030-1038.
- AOSAKI T and KASAI H. (1989) Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **414**, 150-156.
- APPERLY, E., FENIUK, W., HUMPHREY, P.P.A. and LEVY G.P. (1976) Receptors for 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in rabbit isolated ear artery and aorta. *Br. J. Pharmacol.* **58**, 211-221.
- BENHAM, C and TSIEN, R. (1984) Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J. Physiol. (London)* **404**, 767-784.
- BIRNBAUMER, L., CAMPBELL, K.P., CATTERALL, W.A., HARPOLD, M.M., HOFMANN, F., HORNE, W.A., MORI, Y.A, SNUTCH, T.P., TANABE, T. And TSIEN, R.W. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13**, 505-506.
- BORGES, R., SALA, F. and GARCÍA, A.G. (1986) Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J. Neurosci. Methods* **16**, 289-300.
- BOURINET, E., SOONG, T.W., SUTTON, K., SLAYMAKER, S., MATHEWS, E., MONTIEL, A., ZAMPONI, G.W., NARGBOT, J. and SNUTCH, T.P. (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature Neurosci.* **2**, 407-415.
- BRADLEY, P.B., HUMPHREY, P.P.A. and WILLIAMS, R.H. (1986) Evidence for the existence of 5-hydroxytryptamine receptors, which are not of 5-HT₂ type, mediating contraction of rabbit isolated basilar artery. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 3-4.
- BRANDT, B.L., HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. and MIYAZAKI, S. (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol. (London)* **263**, 417-439.
- BRASÓ, A., AGUT, J., RUIZ, A., CARTHEUSER, C.F., SACRISTÁN, A., ORTIZ, J.A. (1994) Dotarizine effects on 5-HT₂ and 5-HT₁ receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, P13.16.1.
- BRASÓ, A., MARTÍNEZ, L., PLANAS, J.M., CARTHEUSER, C.F., SACRISTÁN, A. and ORTIZ, J.A. (1996) Pharmacological profile and actions of dotarizine as a prophylactic antimigraine drug. *Neurology* **243**, S98.

- BRASÓ, A., TEJERINA, T., GONZALEZ, P. and LÓPEZ, J. (1990) Is dotarizine selective?. *Eur. J. Pharmacol.* **183**, 553.
- BUZZI, M.G. and MOSKOWITZ, M.A. (1990) The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 202-206.
- CARBONE, E. and LUX, H.D. (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* **46**, 413-418.
- CARTHEUSER, C.F., BRASÓ, A., SACRISTÁN, A. and ORTIZ, J.A. (1994) Effects of dotarizine on peripheral and pulmonary circulation and cardiac dynamics in dogs. *Pharmacology* **48**, 187-193.
- CATTERALL W.A. (1998) Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* **24**, 307-323.
- CAUVIN, C. and VAN BREEMEN, C. (1984) Extracellular Ca^{2+} dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels. *Blood Vessels* **21**, 23-31
- CAUVIN, C. and VAN BREEMEN, C. (1985) Different calcium entry mechanisms along the arterial tree. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **7**, S4.
- CHIN, H. (1998) Molecular biology of neuronal voltage-gated calcium channels. *Exp. Mol. Med.* **30**, 123-130.
- CHOMICKI, J., JURKIEWICZ, J., ZABOLOTNY, W., CZERNICKI, Z. and CERVOS-NAVARRO, J. (1995) Effect of dotarizine on CO₂-dependent cerebrovascular reactivity. *Acta Neurochir. (Wien)* **136**, 186-188.
- CURTIS, B.M. and CATTERALL, W.A. (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**, 2113-2118.
- CZERNICKI, Z., JURKIEWICZ, J., BOJANOWSKI, K., PIECHNIK, S. and CERVOS-NAVARRO, J. (1996) Effects of the calcium channel blockers dotarizine and flunarizine on cerebrovascular reactivity. *J. Neurol. Sci.* **143**, 60-63.
- DAVIS, K.D. and DOSTROVSKY, J.O. (1986) Activation of trigeminal brain-stem nociceptive neurons by dural artery stimulation. *Pain* **25**, 395-401.
- DIAMOND, S., RYAN, R.E., KLAPPER, J.A., GOLDSTEIN, J., ELKIND, A.H., CADY, R.K. and RUOFF, G.E. (1999) Dotarizine in the prophylaxis of migraine headaches. *Cephalalgia* **19**, 378-379.
- DOUGLAS, W.W. and POISNER, A.M. (1965) Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature* **208**, 1102-1103.

- DUNLAP, K., LUEBKE, J.I. and TURNER T.J. (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **18**, 89-98.
- EISERT, A., SAURBIER, J. and FRICKE, U. (1994) Vascular effects of dotarizine in porcine isolated arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **349**, R43
- FARRÉ, M., ROSET, P.N., LLORENTE, M., MÁRQUEZ, M., ALBET, C., PÉREZ, J.A., HERRERO, E. and ORTIZ, J.A. (1997) Clinical pharmacokinetics and tolerability of dotarizine in healthy subjects after single and multiple oral administration. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **19**, 343-350.
- FENIUK, W., HUMPHREY, P.P.A., PERREN, M.J. and WATTS, A.D. (1985) A comparison of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in rabbit aorta and dog saphenous vein: evidence for different receptor types obtained by use of selective agonists and antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **86**, 697-704.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. and NEHER, E. (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (London)* **331**, 599-635.
- FERRARI, M.D. and SAXENA, P.R. (1993) On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia* **13**, 151-165.
- FLECKENSTEIN-GRUN, G. and FLECKENSTEIN, A. (1990) Scope of vasodilatory effects of calcium antagonists. *Blood Vessels* **27**, 319-323.
- FLETCHER, C.F., COPELAND, N.G. and JENKINS, N.A. (1998) Genetic Analysis of Voltage-dependent Calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 387-398.
- FOZARD, J.R. and KALKMAN, H.O. (1994). 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and the initiation of migraine: new perspectives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 225-229.
- FOX, A.P., NOWYCKY, M.C. and TSIEN, R.W. (1987a) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* **394**, 149-172.
- FOX, A.P., NOWYCKY, M.C. and TSIEN, R.W. (1987b) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* **394**, 173-200.
- FUJITA, T., KANNO, T., KOBAYASHI, S. (1988) The paraneuron. *Springer-Verlag*, Tokio.
- FUJITA, H., TANIZAWA, Y. and HIURA, M. (1976) Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. En: Chromaffin, enterochromaffin and related cells. *Ed. Elsevier*, Amsterdam, 1-12.
- GAINER, H. and CHIN, H. (1998) Molecular diversity in neurosecretion: reflections on the hypothalamo-neurohypophysial system. *Mol. Cell. Neurobiol.* **18**, 209-227.

- GALIANO, L., MATIAS-GUIU, J., HORGA, J.F., MARTÍN, R., FALIP, R. and MONTIEL, I. (1993) Dotarizine a double-blind trial in prophylactic treatment of migraine. *Cephalalgia* **13**, 251.
- GANDÍA, L., LARA, B., IMPERIAL, J.S., VILLARROYA, M., ALBILLOS, A., MAROTO, R., GARCÍA, A.G. and OLIVERA, B.M. (1997) Analogies and differences between omega-conotoxins MVIC and MVIIID: binding sites and functions in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **435**, 55-64.
- GOADSBY, P.J., EDVINSSON, L. AND EKMAN, R. (1990) Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Neurology* **28**, 183-187.
- GODFRAIND, T. (1989) Increasing complexity revealed in regulation of Ca^{2+} antagonist receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 297-301.
- GRANDAW, P.P. and PURDY, R.E. (1996) Serotonin-induced vasoconstriction in rabbit femoral artery: mediation by both 5-HT₂ serotonergic and α_1 -adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**, 854-860.
- GRIFFITH, S.G., LINCOLN, J. and BURNSTOCK, G. (1982) Serotonin as a neurotransmitter in cerebral arteries. *Brain Res.* **247**, 388-392.
- GUBERT, S., BRASÓ, M.A., SACRISTÁN, A. and ORTÍZ, J.A. (1987). Synthesis of some N-benzhydryl-piperazine derivatives as calcium antagonist. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **37**, 1103-1107.
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. and SIGWORTH, F. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells, and cell-free membranes patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85-100.
- HARDEBO, J.E. (1992) Influence of impulse pattern on noradrenaline release from sympathetic nerves in cerebral and some peripheral vessels. *Acta Physiol. Scand.* **144**, 333-339.
- HARGREAVES R.J. and SHEPHEARD S.L. (1999) Pathophysiology of migraine-new insights. *Can. J. Neurol. Sci.* **26**, S9-S12.
- HILLE, B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. *Sinauer Associates Inc.* Massachusetts.
- HILLMAN, D., CHEN, S., AUNG, T.T., CHERKSEY, B., SUGIMORI, M. and LLÉNÁS R. (1991) Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7076-7080.
- HIRATA, H., ALBILLOS, A., JURKIEWICZ, A. and GARCÍA, A.G. (1997) Effects of the Ca^{2+} channel blockers ω -conotoxins GVIA, MVIIA, MVIC and ω -agatoxin IVA on non-adrenergic neurotransmission in the rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **321**, 217-223.

- HOFMANN, F., BIEL, M. and FLOCKERZI, V. (1994) Molecular basis of Ca^{2+} channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 399-418.
- HORGA, J.F., MATÍAS-GUIU, J., CASTILLO, J., LAÍNEZ, J.M., HERNÁNDEZ, M. and FAURA, C.C. (1996) Comparison of dotarizine and pizotifen in prophylactic treatment of migraine: A crossover double-blind multicentre study. *8th World Congress of Pain*. Vancouver, Canada, 501.
- HUMPHREY, P.P., FENIUK, W., MARRIOTT, A.S., TANNER, R.J., JACKSON, M.R. and TUCKER, M.L. (1991) Preclinical studies on the anti-migraine drug, sumatriptan. *Eur. Neurol.* **31**, 282-290.
- IVERSEN, H.K., OLESEN, J. and Tfelt-HANSEN, P. (1989) Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain* **38**, 17-24.
- JOHNSON, K. W., PHEBUS, L.A. and COHEN, M.L. (1998) Serotonin in migraine: theories, animal models and emerging therapies. *Prog. Drug Res.* **51**, 219-244.
- JOUTEL, A., BOUSSER, M.G., BIOUSSE, V., LABAUGE, P., CHABRIAT, H., NIBBIO, A., MACIAZEK, J., MEYER, B., BACH, M.A., WEISSENBACH, J., LATHROP, G.M. and TOURNIER-LASSERVE, E. (1993) A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nature Genetics* **5**, 40-45.
- JUN, K., PIEDRAS-RENTERÍA, E.S., SMITH, S.M., WHEELER, D.B., LEE, S.B., LEE, T.G., CHIN, H., ADAMS, E.A., SCHELLER, R.H., TSIEN, R.W. and SHIN, H-S. (1999) Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the α_{1A} -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 15245-15250.
- KOBAYASHI, S. (1977) Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch. Histol. Jap.* **40**, 61-79.
- KRABBE, A.A. and OLESEN, J. (1980) Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms. *Pain* **8**, 253-259.
- KURIDZE, N., CZERNICKI, Z., JARUS-DZIEDZIC, K., JURKIEWICZ, J. and CERVOS-NAVARRO, J. (2000). Regional differences of cerebrovascular reactivity affected by calcium channel blocker-dotarizine. *J. Neurol. Sci.* **175**, 13-16.
- LANCE, J.W. (1981). Headache. *Ann. Neurol.* **10**, 1-10.
- LANCE, J.W. (1993) Current concepts of migraine pathogenesis. *Neurology* **43**, S11-S15.
- LARA, B., GANDÍA, L., TORRES, A., OLIVARES, R., MARTÍNEZ-SIERRA, R., GARCÍA, A.G. and LÓPEZ, M.G. (1997) "Wide spectrum calcium antagonists": lipophilicity, inhibition, and recovery of secretion in chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.* **325**, 109-119.

- LASSEN, L.H., THOMSEN, L.L. and OLESEN, J. (1995) Histamine induces migraine via the H₁-receptor. Support for the NO hypothesis of migraine. *Neuroreport* **6**, 1475-1479.
- LAURITZEN, M. (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* **117**, 199-210.
- LAURITZEN, M., OLSEN, T.S., LASSEN, N.A. and PAULSON, O.B. (1983) Changes in regional cerebral blood flow during the course of classic migraine attacks. *Ann. Neurol.* **13**, 633-641.
- LEE, Y., KAWAI, Y., SHIOSAKA, S., TAKAMI, K., KIYAMA, H., HILLYARD, C.J., GIRGIS, S., MACINTYRE, I., EMSON, P.C. and TOHYAMA, M. (1985) Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **330**, 194-196.
- LEE, W.S., LIMMROTH, V., AYATA, C., CUTRER, F.M., WAEBER, C., YU, X. and MOSKOWITZ, M.A. (1995) Peripheral GABAA receptor-mediated effects of sodium valproate on dural plasma protein extravasation to substance P and trigeminal stimulation. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 1661-1667.
- LIPSCOMBE, D., KONGSAMUT, S. and TSIEN, R. (1989) Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* **340**, 639-642.
- LIVETT, B.G. (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* **64**, 1103-1161.
- LLINÁS, R., SUGIMORI, M., LIN, J.W. and CHERKSEY, B. (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1689-1693.
- LÓPEZ, M.G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTÍNEZ-SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. and GANDÍA, L. (1994) Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* **349**, 331-337.
- LUEBKE JI, DUNLAP K, TURNER TJ. (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* **11**, 895-902.
- MARÍN, J. and BALFAGÓN, G. (1998). Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and the involvement of β-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 473-478.
- MARKOWITZ, S., SAITO, K. and MOSKOWITZ, M.A. (1987) Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but no brain. *J. Neurosci.* **7**, 4129-4136.

- MARTINS, I.P., BAETA, E., PAIVA, T., CAMPOS, J. and GOMES, L. (1993) Headaches during intracranial endovascular procedures: a possible model of vascular headache. *Headache* **33**, 227-233.
- McCULLOCH, J., UDDMAN, R., KINGMAN, T.A. and EDVINSSON, L. (1986) Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 5731-5735.
- MINTZ, I.M., ADAMS, M.E. and BEAN, B.P. (1992a) P-type calcium channels in central and peripheral neurons. *Neuron* **9**, 1-20.
- MINTZ, I.M., VENEMA, V.J., SWIDEREK, K., LEE, T., BEAN, B.P. and ADAMS, M.E. (1992b) P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature* **355**, 827-829.
- MONTIEL, C., HERRERO, J.G., GARCÍA-PALOMERO, E., RENART, J. and GARCÍA, G.A. (1997) Serotonergic effects of dotarizine in coronary artery and in oocytes expressing 5-HT₂ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **332**, 183-193.
- MORI, Y., FRIEDRICH, T., KIM, M-S., MIKAMI, A., NAKAI, J., RUTH, P., BOSSE, E., HOFMANN, F., FLOCKERZL, V., FURUICHI, T., MIKOSHIBA, K., IMOTO, K., TANABE, T. and NUMA, S. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* **350**, 398-402.
- MORO, M.A., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., MICHELENA, P. and GARCÍA, A.G. (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal. Biochem.* **185**, 243-248.
- MOSKOWITZ, M.A. (1992) Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 307-311.
- MOSKOWITZ, M.A. (1993) Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology* **43**, S16-S20.
- MOSKOWITZ, M.A. and MACFARLANE, R. (1993) Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Brain Metab. Rev.* **5**, 159-177.
- MULVANY, M.J. and HALPERN, W. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* **41**, 19-26.
- NELSON, M.T. and WORLEY, J.F. (1989) Dihydropyridine inhibition of single calcium channels and contraction in rabbit mesenteric artery depends on voltage. *J. Physiol. (London)* **412**, 65-91.
- NOWYCKY, M.C., FOX, A.P. and TSIEN, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.

- NOVALBOS, J., ABAD-SANTOS, F., ZAPATER, P., CANO-ABAD, M.F., MORADIELLOS, J., SÁNCHEZ-GARCÍA, P. and GARCÍA, A.G. (1999a). Effects of dotarizine and flunarizine on chromaffin cell viability and cytosolic Ca^{2+} . *Eur. J. Pharmacol.* **366**, 309-317.
- NOVALBOS, J., ABAD-SANTOS, F., ZAPATER, P., ÁLVAREZ, J., ALONSO, M.T., MONTERO, M. and GARCÍA, A.G. (1999b) Novel antimigraineur dotarizine releases calcium from caffeine-sensitive calcium stores of chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 621-626.
- OLESEN, J., THOMSEN, L.L. and IVERSEN, H. (1994) Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 149-153.
- OLESEN, J., THOMSEN, L.L., LASSEN, L.H. and OLESEN, I.J. (1995) The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* **15**, 94-100.
- OLIVERA, B.M., MILJANICH, G., RAMACHANDRAN, J. and ADAMS, M. (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxin and ω -agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 823-867.
- ONOZUKA, M., WATANABE, K., NAGASAKI, S., OZONO, S., HAYASHI, H., YAMAMOTO, T., KARASAWA, N. and NAGATSU, I. (1996a). Involvement of dotarizine in nigrostriatal dopamine system of adult and aged rats: Biochemical and immunohistochemical analysis. *Biog. Amines* **12**, 69-82.
- ONOZUKA, M., WATANABE, K., NAGASAKI, S. and NISHIYAMA, K., (1996b) Dotarizine, a newly produced diphenylpiperazine derivative calcium channel blocker, inhibits [3H] spiperone binding to striatal dopamine receptors. *Med. Sci. Res.* **24**, 57-59.
- OPHOFF, R.A., TERWINDT, G.M., FRANTS, R.R. and FERRARI, M.D. (1998) P/Q-type Ca^{2+} channel defects in migraine, ataxia and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 121-127.
- OPHOFF, R.A., TERWINDT, G.M., VERGOUWE, M.N., FRANTS, R.R. and FERRARI, M.D. (1997) Wolff Award 1997. Involvement of a Ca^{2+} channel gene in familial hemiplegic migraine and migraine with and without aura. Dutch Migraine Genetics Research Group. *Headache* **37**, 479-485.
- OPHOFF, R.A., TERWINDT, G.M., VERGOUWE, M.N., VAN EIJK, R., OEFNER, P.J., HOFFMAN, S.M., LAMERDIN, J.E., MOHRENWEISER, H.W., BULMAN, D.E., FERRARI, M., HAAN, J., LINDHOUT, D., VAN OMMEN, G.J., HOFKER, M.H., FERRARI, M.D. and FRANTS, R.R. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**, 543-552.
- OTTOSSON, A. and EDVINSSON, L. (1997) Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia* **17**, 166-174.

- PARSONS, A. (1991) 5-HT receptors in human and animal cerebrovasculature. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**, 310-315.
- PERELLÓ, E., ESTELLER, E., COLLS, A., MAGRINA, C., MASSEGUR, H., LLUANSI, J., CASAMITJANA, J.F., LAO, X., ROCA-RIBAS, F., MIRO, N., PRADES, J., HERRERO, E., MOLA, O., TORRES, J., MARQUEZ, M. and ORTIZ, J.A. (1998) Efficacy and safety of dotarizine vs. cinnarizine in the symptomatic treatment of acute balance disorders (common vertigo). *An. Otorrinolaringol. Ibero. Am.* **25**, 291-310.
- PETKOV, V.D., BELCHEVA, S. and KONSTANTINOVA, E. (1995) Anxiolytic effects of dotarizine, a possible antimigraine drug. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **17**, 659-668.
- PETKOV, V.D., BELCHEVA, S., KONSTANTINOVA, E., VAGLENOVA, J. and PETKOV, V.V. (1994) Behavioral effects of the Ca²⁺/5-HT antagonist dotarizine. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **20**, 9-17.
- PLUMMER, M.R., LOGOTHETIS, D.E. and HESS, P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.
- RANDALL, A. and TSIEN, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* **15**, 2995-3012.
- RANDALL, A.D., WENDLAND, B., SCHWETZER, F., MILJANICH, G., ADAMS, M.E. and TSIEN, R.W. (1993) Five pharmacologically distinct high voltage-activated Ca²⁺ channels in cerebellar granule cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* **19**, 1478.
- RANDALL, A.D. (1998) The molecular basis of voltage-gated Ca²⁺ channel diversity: is it time for T? *J. Membr. Biol.* **161**, 207-213.
- RASKIN, N.H. (1981) Pharmacology of migraine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**, 463-478.
- RUIZ-NUÑO, A., VILLARROYA, M., CANO-ABAD, M.F., ROSADO, A., LÓPEZ, M.G. and GARCÍA, A.G. (2001) Mechanism of blockade by the novel migraine prophylactic agent, dotarizine, of various brain and peripheral vessel contractility. *Eur. J. Pharmacol.* **411**, 289-299.
- SAITO, K., MARKOWITZ, S. and MOSKOWITZ, M.A. (1988). Ergot alkaloids block neurogenic extravasation in dura mater: proposed action in vascular headaches. *Ann. Neurol.* **24**, 732-737.
- SCHMUCK, K., ULLMER, C, KALKMAN, H.O., PROBST, A. and LUBBERT, H. (1996) Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptor: an early step in the generation of migraine headache? *Eur. J. Neurosci.* **8**, 959-967.
- SILVESTRINI, M., CUPINI, L.M., TROISI, E., MATTEIS, M. and BERNARDI G. (1995) Estimation of cerebrovascular reactivity in migraine without aura. *Stroke* **26**, 81-83.

- SNUTCH, T.P. and REINER, P.B. (1992) Ca^{2+} channels: diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 247-253.
- STARR, T.V.P., PRYSTAY, W. and SNUTCH, T.P. (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5621-5625.
- SUTTON, K.G., ZAMPONI, G.W., BOURINET, E., SOONG, T.W. and SNUTCH, T.P. (1998) Alternative splicing of the α_{1A} gene generates distinct P- or Q-type sensitivity to ω -agatoxin IVA. *Soc. Neurosci. Abstr.* **24**, 21.
- TAKAHASHI, T. and MOMIYAMA, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**, 156-158.
- TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. and NUMA, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318.
- TEJERINA, T., CAUVIN, C. and TAMARGO, J. (1992) Effects of oxodipine on isolated and mesenteric resistance vessels. *Eur. J. Pharmacol.* **219**, 279-284.
- TEJERINA, T., CHULIA, T. and GONZÁLEZ, P. (1993) Effects of dotarizine on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ movements and contractile responses in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **239**, 75-81.
- TERWINDT, G.M., OPHOFF, R.A., HAAN, J., SANDKUIJL, L.A., FRANTS, R.R. and FERRARI, M.D. (1998) Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group. *Eur. J. Hum. Genet.* **6**, 297-307.
- THOMSEN, L.L., IVERSEN, H.K., BRINCK, T.A. and OLESEN, J. (1993) Arterial supersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia* **13**, 395-399.
- THOMSEN, L.L. and OLESEN, J. (2001) Nitric oxide in primary headaches. *Curr. Opin. Neurol.* **14**, 315-321.
- TITUS, F., ALBERCA, R., DÍEZ-TEJEDOR, E., GONZÁLEZ-ELIPSE, J., GRANÉS, P., JIMÉNEZ, D., LIAÑO, H., LOZANO, R., MARTÍ-MASSÓ, J.F., MERCADAL, J., MORALES, F., NOVELL, R., SECADES, J. and TARGA, C. (1999) Double-blind clinical trial in phase III comparing the efficacy and safety of dotarizine and flunarizine in the prevention of migraine. *Cephalalgia* **19**, 375-376.
- TORREGROSA, G., BARBERA, M.D., ORTI, M., CENTENO, J.M., SALOM, J.B. and ALBORCH, E. (1999) Cerebrovascular effects of dotarizine, a piperazine derivative, in

- the goat. An in vivo and in vitro complementary study. *Arzneimittelforschung* **49**, 668-672.
- TOTARO, R., MARINI, C., DE MATTEIS, G., DI NAPOLI, M. and CAROLEI, A. (1997). Cerebrovascular reactivity in migraine during headache-free intervals. *Cephalalgia* **17**; 191-194.
- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T. and HORNE, W.A. (1991) Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 349-354.
- UCEDA, G., MICHELENA, P., LÓPEZ, M., GARCÍA, A.G. and COLOMBO, J. (1995) Rat striatal astroglia induces morphological and neurochemical changes in adult bovine, adrenergic-enriched adrenal chromaffin cells in vitro. *Restor. Neur. Neurosci.* **8**, 129-136.
- UDDMAN, R. and EDVINSSON, L. (1989) Neuropeptides in the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**, 230-252.
- UNSICKER, K., GRIESSER, G.H., LINDMAR, R., LOFFELHOLZ, K. and WOLF, U. (1980) Establishment, characterization and fibre outgrowth of isolated bovine adrenal medullary cells in long-term cultures. *Neuroscience* **8**, 1445-1460.
- USOWICZ, M.M., SUGIMORI, M., CHERKSEY, B. and LLINÁS, R. (1992) P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **9**, 1185-1199.
- VEGA, T., DE PASCUAL, R., BULBENA, O. and GARCÍA, A.G. (1995) Effects of ω -toxins on noradrenergic neurotransmission in beating guinea-pig atria. *Eur. J. Pharmacol.* **276**, 231-238.
- VILLARROYA, M., GANDÍA, L., LARA, B., ALBILLOS, A., LÓPEZ, M.G. and GARCÍA, A.G. (1995) Dotarizine versus flunarizine as calcium antagonists in chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 369-376.
- WAKADE A.R. and EDGAR D., THEONEN H. (1982) Substrate requirement and media supplements necessary for the long-term survival of chick sympathetic and sensory neurons cultured without serum. *Expl. Cell Res.* **140**, 71-78.
- WAKADE A.R. and WAKADE T.D. (1988) Comparison of transmitter release properties of embryonic sympathetic neurons growing in vivo and in vitro. *Neuroscience* **27**, 1007-1019.
- WELCH, K.M. and RAMADAN, N.M. (1995). Mitochondria, magnesium and migraine. *J. Neurol. Sci.* **134**, 9-14.
- WHEELER, D.B., RANDALL, A., SATHER, W.A. and TSIEN, R.W. (1995) Neuronal calcium channels encoded by the alpha 1A subunit and their contribution to excitatory transmission in the CNS. *Brain Res.* **105**, 65-78.

- WHEELER, D.B., RANDALL, A. and TSIEN, R.W. (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264**, 107-111.
- WILLIAMSON, J.W., FRIEDMAN, D.B., MITCHELL, J.H., SECHER, N.H. and FRIBERG, L. (1996) Mechanisms regulating regional cerebral activation during dynamic handgrip in humans. *J. Appl. Physiol.* **81**, 1884-1890.
- WILSON, S.P. and KIRSHNER, N. (1977) The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J. Neurochem.* **28**, 687-695.
- WOLFF, H.G. (1987) Wolf's Headaches and Other Head Pain, 5th ed. (Dalessio, D.J., ed.) Oxford University Press, New York.
- WOOD, P. and BUNGE, R.P. (1975) Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature* **256**, 662-664.
- YILDEZ, O. and TUNCER, M. (1995) 5-HT_{1-like} and 5-HT_{2A} receptors mediate 5-HT-induced contraction of rabbit isolated mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **352**, 127-131.

