

R. 27.762

Te 612.015.
PUE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

BIBLIOTECA UCM



5301486301

**EFFECTOS PRESORES POR ESTIMULO DE
RECEPTORES ALFA VASCULARES CON
MODIFICACIONES DE LA CALCEMIA**



Miguel Fco. Puerro Vicente

Madrid, 1993

Colección Tesis Doctorales. N.º 184/93

X-53-125458-4

© Miguel Fco. Puerro Vicente

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1993.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-30755-1993



La Tesis doctoral de D. MIGUEL PUERRO VICENTE

titulada Efectos presores por estímulo de receptores alfa
vasculares con modificaciones de la calcemia

Director Dr. D.º Amaya ALEXANDRE ARTIÑANO

fue leída en la Facultad de MEDICINA de la
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

el día 9 de julio de 1992 ante el tribunal constituido
por los siguientes Profesores:

Presidente ARTURO ANADON NAVARRO

Vocal PEDRO LORENZO FERNANDEZ

Vocal ROSA MARTINEZ LARRANAGA

Vocal EMILIA SANZ ALVAREZ

Secretario ALFONSO MORENO GONZALEZ

habiendo recibido la calificación de

APTO Cum Laude por unanimidad

Madrid, a 9 de julio de 1992

El Secretario del Tribunal,

MIGUEL FCO. PUERRO VICENTE

EFFECTOS PRESORES POR ESTIMULO DE
RECEPTORES ALFA VASCULARES CON
MODIFICACIONES DE LA CALCEMIA

DIRECTOR: Dra. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano
Profesor Titular de Farmacología

-UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID-
-FACULTAD DE MEDICINA-
-DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA-

1992

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

M^a AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, Profesor Titular de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo experimental titulado "EFECTOS PRESORES POR ESTIMULO DE RECEPTORES ALFA VASCULARES CON MODIFICACIONES DE LA CALCEMIA" ha sido realizado por D. Miguel Puerro Vicente bajo mi dirección y tutela, reuniendo todas las condiciones necesarias para que con él pueda aspirar a la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía (Farmacología).

Y para que así conste a los efectos oportunos, autorizo la presentación a trámite de dicha Tesis Doctoral ante la Comisión de Doctorado.

Madrid, 2 de Junio de 1992

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____

(fecha y firma)

N.I.F.:

Fdo.: A. Aleixandre

(fecha y firma)

N.I.F.: 644852-R

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

EL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

INFORMA:

Favorablemente la presentación, exposición y defensa del Proyecto de trabajo presentado por D. MIGUEL PUERRO VICENTE y dirigida por Dña. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano, dado que reúne las condiciones académicas y científicas requeridas para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 8 de Junio de 1992

Fecha reunión
Consejo Departamento

8 - Junio - 1.992.

El Director del Departamento

Fdo.: Prof. P. Lorenzo

(fecha y firma)

DEDICATORIA

A mi mujer Mercedes, por su gran comprensión y sacrificio personal.

A mis hijos María, Miguel y Jose Manuel, en la esperanza de que pueda servirles de estímulo y orgullo legítimo en su espléndido futuro.

A todos aquellos que se esfuerzan por aprender.

AGRADECIMIENTO:

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Pedro Lorenzo Fernandez, Director del Departamento de Farmacología, por su buena disposición al brindarme realizar en este Departamento la presente Tesis Doctoral, y facilitar los medios necesarios para su realización.

A la Dra. M^a Amaya Aleixandre de Artiñano, directora de la Tesis, su enorme y exhaustiva labor de dirección; y al Dr. Pintado al haberme facilitado el aprendizaje de la técnica de "pithed-rat".

A los Dres. Hernandez, Blasco y Martinez, del Hospital Universitario del Aire, por su fundamental participación en la realización de las determinaciones analíticas.

Mención muy especial he de hacer al personal laboral del Departamento, Rubén Vara, Carlos Menendez, y Manuel Solís, por su gran ayuda y dedicación en el control, seguimiento y manejo de los animales.

Y en definitiva, a todos los que forman parte del Departamento de Farmacología, pues en una medida o en otra, de todos he recibido enseñanzas, ánimos, y en muchos casos su amistad.

INDICE

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS.....	1
1.- INTRODUCCION.....	3
1.1.- Distribución del calcio en el organismo y su determinación sérica.	4
1.2.- Metabolismo del calcio.....	7
1.2.1.- Hormona paratiroidea.....	8
1.2.2.- Vitamina D.....	10
1.2.3.- Calcitonina.....	16
1.3.- Importancia del calcio para la contracción vascular.....	19
1.4.- Hipocalcemias.....	41
1.4.1.- Causas de hipocalcemia.....	41
1.4.2.- Clínica de las hipocalcemias.....	44
1.5.- Toxicidad del calcio.....	45
1.5.1.- Hipercalcemias.....	45
1.5.1.1.- Causas de hipercalcemia.....	45
1.5.1.2.- Clínica de las hipercalcemias.....	49
1.5.2.- Calcifilaxia y calcergia.....	51
1.5.3.- Manifestaciones locales.....	52
2.- ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3.- MATERIAL Y METODOS.....	60
3.1.- Determinaciones analíticas.....	61
3.2.- Inducción de hipocalcemia en ratas.....	62
3.3.- Inducción de hipercalcemia en ratas.....	63
3.3.1.- Inducción de hipercalcemia aguda.....	63
3.3.2.- Inducción de hipercalcemia subcrónica y crónica.....	63
3.4.- Preparación de "pithed-rat".....	67
3.5.- Ensayos en "pithed-rat".....	69
3.6.- Tratamiento estadístico de los datos.....	72
4.- RESULTADOS.....	73
4.1.- Modelos de hipocalcemia en ratas.....	74
4.2.- Modelos de hipercalcemia en ratas.....	78

4.2.1.- Hipercalcemia aguda.....	78
4.2.2.- Hipercalcemia subcrónica y crónica.....	87
4.3.- Resultados en "pithed-rat".....	101
4.3.1.- Ratas con hipocalcemia.....	101
4.3.2.- Ratas con hipercalcemia aguda.....	111
4.3.3.- Ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica.....	129
5.-DISCUSION.....	138
6.-CONCLUSIONES.....	163
7.-BIBLIOGRAFIA.....	165

ABREVIATURAS

Å: angstrom
A: adrenalina
AMPC: adenosin monofosfato cíclico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosin trifosfato
C: centígrado
cm: centímetro
cc: centímetro cúbico
CT: calcitonina
d: daltons
dl: decilitro
EDTA: etilendiaminotetraacetato
EGTA: etilen-glicol(β -aminoetileter)tetraacetato
ESM: error standard de la media
FHP: factor hipertensivo paratiroideo
g: gramo
GMPc: guanosin monofosfato cíclico
h: hora
i.c.v.: intracerebroventricular
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
IP₃: inositol 1,4,5 trifosfato
i.v.: intravenoso
kg: kilogramo
l: litro
M: molar
mEq: miliequivalente
mg: miligramo
min: minuto
mm: milímetro
mM: milimolar
 μ g: microgramo
 μ M: micromolar
NA: noradrenalina

NO: óxido nítrico
PAD: presión sanguínea diastólica
PAS: presión sanguínea sistólica
PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
Pm: peso molecular
pmol: picomolar
PTH: hormona paratiroidea
ROC: canal(es) operado(s) por receptor o receptor dependiente(s)
r.p.m.: revoluciones por minuto
s.c.: subcutánea
U.I.: unidades internacionales
Vit D₃: vitamina D₃
VOC: canal(es) operado(s) por voltaje o voltaje dependiente(s)
WKY: Wistar Kioto

1.INTRODUCCION

1.1. DISTRIBUCION DEL CALCIO EN EL ORGANISMO Y SU DETERMINACION SERIK

Los datos expuestos en este apartado han sido tomados de: Harrison y Herr (1979), Weissman y Pileggi (1980), Laurence, y Bernat (1987), y Prieto (1989).

El hueso compacto está formado por alrededor de un 25 % en peso de matriz orgánica y un 75 % en peso de sales. Estas sales cristalinas que se depositan en la matriz orgánica del hueso, son principalmente sales de calcio y fosfato, siendo la hidroxiapatita la sal más importante. Estos cristales cálcicos presentan forma de placa delgada y alargada, de 200 a 400 Å de longitud y de 10 a 30 Å de ancho, existiendo en ellos iones Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , CO_3H^- que no forman redes cristalinas sino que se encuentran situados en la superficie de los cristales de hidroxiapatita. En realidad esto representa el 98-99 % del calcio corporal y el 85 % del fósforo. El 1-2 % de calcio restante está en otros tejidos, representando unos 11 g. De estos últimos, la mayor parte, unos 10 g hallan en el espacio intracelular, y el otro gramo corresponde al calcio extracelular. A su vez, de este calcio extracelular, 650 mg corresponden al calcio no plasmático, y los 300 mg restantes al calcio plasmático. Esto supone que la concentración de calcio plasmático es de aproximadamente 9.5 mg %, lo que supone una concentración aproximada de 1.25 mEq/l, y se aceptan en el hombre como valores normales unos márgenes muy estrechos (8.5 - 10.5 mg %). Del 65-45 % del calcio plasmático se encuentra como calcio libre ionizado, un 5-10 % como calcio difusible no ionizado, formando complejos de sustancias como el citrato o fosfato, y el 30-45 % restante se encuentra unido a la albúmina. Como calcio plasmático total, el calcio iónico es el único fisiopatológicamente activo. En la figura nº 1 (pag. 5), aparece un esquema de la distribución del calcio en el organismo.

En el niño el calcio y el fósforo se retienen para el crecimiento del esqueleto, pero en el adulto la cantidad que se retiene sirve fundamentalmente para compensar las pérdidas obligadas que generalmente tienen lugar por orina y heces. En el embarazo y lactancia hay pérdidas fosfocálcicas aumentadas por el paso de estos elementos al feto y a la leche respectivamente. La eliminación renal está controlada por la reabsorción tubular y la intestinal, en menor grado, por la secreción endógena. Por consiguiente tanto el niño como el adulto necesitan adaptar el balance de calcio y fósforo a las necesidades del esqueleto frente a las variaciones de la eliminación y de la dieta.

Junto con estos requerimientos existe la necesidad de mantener una concentración constante de calcio iónico, esencial para la normal función neuromuscular y probablemente para otras funciones celulares como la secreción y el transporte. Puede ser también necesaria una concentración constante de fosfato.

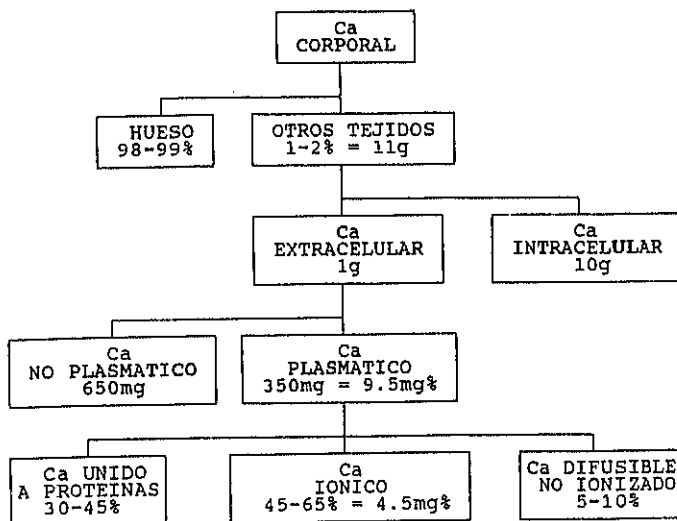


FIGURA 1.- Distribución del calcio en el organismo.

En el plasma las cifras normales de calcio iónico son de 4,3-4,7 mg/dl o de 1,8-2,2 mEq/l. Dado que la determinación del calcio iónico es muy cara y laboriosa, no suele medirse directamente, calculándose de forma indirecta a partir de fórmulas ya establecidas. Entre los diversos procedimientos de determinación indirecta descritos para la cuantificación del calcio ionizado en suero figuran: determinación del calcio total en el líquido cefalorraquídeo, puesto que este valor es equivalente al del calcio ionizado en suero, excepto una pequeña cantidad conjugado pero difusible existente en el líquido cefalorraquídeo; determinación del calcio ionizado por diálisis o ultracentrifugación a través de una membrana semipermeable, técnica que requiere el disponer de un utilaje especial y el controlar cuidadosamente el pH y la temperatura; separación del calcio ionizado mediante el empleo de la ultracentrifuga; determinación del calcio ionizado como la diferencia entre el contenido en calcio del suero antes y después de la eliminación del calcio ionizado mediante resinas de intercambio iónico o resinas a base de charcoal; mediante el efecto que tiene la adición del suero problema sobre la coagulación de un plasma normal descalcificado; mediante la medida "in vitro" de la calcificación de cartílago

de rata raquítica; determinando el efecto sobre una preparación de corazón de rana aislada utilizando la "ultrafiltración in vivo"; y utilizando la gel filtración, técnica en la cual calcula el calcio no conjugado a partir de la diferencia entre la concentración de calcio antes y después del equilibrio con un gel de dextrano deshidratado (Sephadex).

Existen otros procedimientos determinando el calcio total y la concentración proteínas totales, y calculando entonces el calcio ionizado mediante el nomograma McLean y Hastings representado en la figura 2.

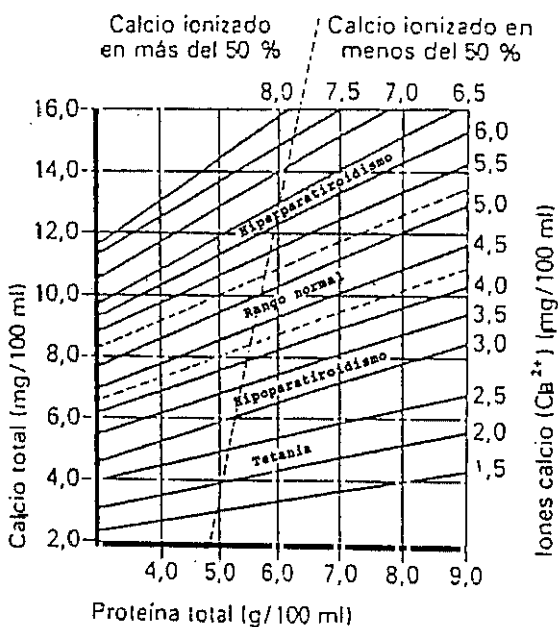


FIGURA 2.- Diagrama de McLean y Hastings para la determinación del calcio iónico a partir de calcio plasmático y proteínas totales. (Tomado de Harrison y Harrison 1979).

Además, puede utilizarse para la estimación del calcio iónico la fórmula de Zeisler (citado por Weissman y Pileggi, 1980), basada también en los cálculos originales de McLean y Hastings, que se representa a continuación:

$$\text{Ca}^{2+}/100\text{ml} = \frac{6[\text{Ca}] - (\text{PT}/3)}{\text{PT} + 6}$$

Donde [Ca] = mg de calcio total/100ml y PT = g de proteínas/100ml.

En diversos estudios se ha demostrado la existencia de una buena correlación entre los valores para el calcio ionizado en los sueros normales, obtenidos por medida directa, y los logrados mediante el empleo de los métodos de cálculo basados en los estudios de McLean y Hastings. Sin embargo algunas situaciones patológicas pueden alterar esta correlación.

El calcio iónico puede variar independientemente de que existan variaciones o no del calcio total. Así por ejemplo, en la hipoalbuminemia disminuye el calcio total, pero el calcio iónico se mantiene normal y el paciente no presenta signos de hipocalcemia. Por otra parte, conviene recordar que la combinación del Ca^{2+} con la albúmina está determinada por cargas electrostáticas y, por consiguiente, será influida por el pH plasmático. Así, por ejemplo, a pH inferiores al fisiológico, la molécula de albúmina estará más protonada, por lo que, al tener en su superficie una menor carga negativa neta, su capacidad de unión con el Ca^{2+} será menor. Por el contrario, la alcalosis aumenta la fijación del Ca^{2+} a las proteínas, disminuyendo así la proporción de Ca^{2+} libre circulante.

1.2. METABOLISMO DEL CALCIO

Los datos generales de este apartado han sido tomados de Peacock (1981), Soler de la Mano et al. (1985), Florez et al. (1986), Vilardell (1988), Prieto (1989), y Haynes (1991).

Las hormonas reguladoras esenciales para el control del metabolismo del calcio y fósforo son la hormona paratiroidea (PTH), la vitamina D_3 (Vit D_3) y la calcitonina (CT). Hay otras hormonas también implicadas: como la hormona del crecimiento, prolactina, esteroides sexuales, tiroxina y cortisol, todas ellas con papeles subsidiarios. Veremos a continuación el papel de la PTH, la Vit D_3 y la CT en dicho metabolismo.

1.2.1. HORMONA PARATIROIIDEA. (PTH).

La PTH es un polipéptido de 84 aminoácidos y peso molecular 9.500. (Ver figura nº 3).

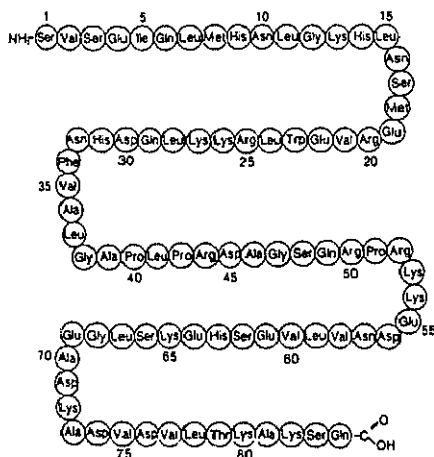


FIGURA 3.- Esquema de la secuencia estructural de la hormona paratiroidea humana. (Tomado de Vilardel 1988).

La PTH se produce en cuatro glándulas que juntas pesan unos 200 mg en el adulto. Estas glándulas están en general íntimamente relacionadas con el tiroides, tanto en lo que respecta a su posición como al suministro de sangre, aunque pueden ubicarse en cualquier parte del cuello o mediastino.

La PTH proviene de un precursor llamado hormona preparatiroidea de 113 aminoácidos, que en la cisterna del retículo endoplásmico pierde 23 aminoácidos y se convierte en la hormona de 90 aminoácidos. Finalmente, en el aparato de Golgi pierde 6 aminoácidos más por el extremo ácido de la cadena. Toda la información estructural necesaria para la actividad biológica se encuentra en los primeros 34 aminoácidos del lado amino. En los tejidos, la hormona es metabolizada a fragmentos polipeptídicos más

pequeños que recirculan por el plasma.

Además de la hormona de 84 aminoácidos que constituye cuantitativa y biológicamente el principal producto de las paratiroides, en plasma pueden hallarse también pequeñas cantidades relativas de sus precursores y de fragmentos amino- y carboxiterminales de la PTH. Estos fragmentos, bien segregados por las propias paratiroides, o bien fruto de la escisión enzimática de la hormona, carecerían de actividad biológica significativa, pero interfieren en los radioinmunoensayos que pretenden cuantificar los niveles de PTH. Así, enzimas renales y/o hepáticas con actividad catepsínica, "romperían" la molécula de PTH entre los aminoácidos 33-34 y 36-37, dando lugar a fragmentos 1-33, 34-84, 1-36 y 37-84, capaces de combinarse con anticuerpos dirigidos frente al extremo amino- o carboxi-terminal de la hormona.

Debe destacarse que aproximadamente el tercio aminoterminal (aminoácidos 1-34) posee la estructura necesaria para la actividad biológica. Estudios realizados con ese fragmento, ya sintetizado en el laboratorio, han demostrado que posee la misma actividad que el péptido completo tanto "in vitro" como "in vivo". Y si la actividad biológica se localiza fundamentalmente en el extremo 1-34, el tramo responsable de la combinación con el receptor es el fragmento 3-34.

Existe un control de la producción y secreción de PTH, siendo la caída de la concentración de calcio iónico plasmático el principal estímulo. Un mecanismo de retroalimentación negativo entre el calcio plasmático y la secreción de PTH es responsable de la relativa constancia del nivel de calcio plasmático. Los receptores sensibles al Ca^{2+} de la glándula paratiroides también responden al ion Mg^{2+} . Aunque una caída del magnesio plasmático puede estimular la PTH, paradójicamente con niveles excesivamente bajos de magnesio plasmático la producción de PTH disminuye, ya que el ión Mg^{2+} es esencial para su secreción.

La célula paratiroidea responde inmediatamente a cambios del calcio plasmático aumentando la producción y secreción. La máxima producción y la secreción basal son proporcionales a la masa glandular. Si la hipocalcemia es prolongada, se estimula la división celular y la glándula se hipertrofia. Una vez que la glándula se ha hipertrofiado, necesita de varios meses de normocalcemia para volver a su tamaño original. En este tiempo el calcio plasmático puede situarse en el rango de la hipercalcemia.

La función principal de la PTH es defender al organismo de la hipocalcemia; para ello libera calcio del hueso, conserva calcio en el riñón, aumenta la absorción de calcio en el intestino, estimulando la producción de Vit D₃, y reduce los fosfatos del plasma.

La PTH actúa sobre receptores específicos de la membrana celular, vinculados a

la adenilciclasa, en el riñón y hueso. Así se libera intracelularmente adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que transmite el estímulo dentro de la célula. La acción de la PTH se acompaña por este motivo, de un aumento de la eliminación urinaria de AMPc.

A nivel renal es de resaltar la participación de la PTH en el metabolismo del calcio y fósforo. En ausencia de PTH, el 97 % del calcio filtrado por el riñón es eliminado. La PTH aumenta la reabsorción de calcio, el umbral renal del calcio y por tanto la calcemia. Por otra parte, en ausencia de PTH más del 90 % del fosfato filtrado es reabsorbido. La PTH disminuye la reabsorción tubular de fosfato, y desciende el umbral renal permitiendo la misma eliminación de fosfato con bajas concentraciones plasmáticas del mismo.

Además, la PTH estimula la producción renal de Vit D₃ a partir de su precursor plasmático 25-hidroxicoalciferol. La producción aumentada de Vit D₃ estimula la absorción de calcio y fósforo. Entre otros efectos de menor importancia podemos citar, que la PTH disminuye la reabsorción tubular de bicarbonato produciendo una orina alcalina e incluso una acidosis moderada. La reabsorción tubular de sodio y magnesio están también aumentadas.

En el hueso la PTH incrementa la liberación neta de calcio y fosfato al líquido extracelular. Esto se debe al efecto directo de la hormona sobre la diferenciación y actividad de todas las células óseas. Acelera la velocidad de transformación de macrófagos en osteoclastos, y aumenta la actividad resorbida de osteoclastos y osteocitos. La PTH probablemente regula la entrada y salida de calcio en las células óseas, bombeando por así decirlo, calcio hacia el líquido extracelular y el plasma; para que esta acción tenga lugar es necesaria la presencia permisiva de Vit D₃. La Vit D₃ jugaría por tanto un papel permisivo de las funciones de la PTH sobre el hueso. Cuando actúa la PTH tanto el mineral como el colágeno son escindidos y liberados a la circulación. Ya que la prolina no es reutilizada para formar colágeno, la eliminación urinaria de hidroxiprolina se considera como índice de la acción ósea de la PTH.

1.2.2. VITAMINA D₃. (Vit D₃).

Vitamina D es el nombre de dos sustancias afines liposolubles, colecalciferol y calciferol, que tienen en común la capacidad de prevenir o curar el raquitismo.

Su actividad se valora en unidades internacionales (U.I.), que equivalen a la actividad biológica específica de 0,025 µg de Vit D₃ (1 mg de Vit D₃ es igual a 40000 U.I.).

La vitamina D puede considerarse una hormona que tiene un papel importante en

el control exacto de la concentración plasmática de ión calcio. Las siguientes características de la vitamina D avalan su actividad hormonal. La vitamina D se sintetiza en la piel y en condiciones ideales no es necesaria probablemente en la dieta; es transportada por la sangre a sitios distantes del organismo, donde es activada; su forma activa afecta entonces tejidos efectores con aumento de la concentración plasmática de calcio; y por último la conversión de vitamina D en su forma activa es una reacción regulada por el calcio plasmático mediante un sistema de retroalimentación negativa.

La irradiación ultravioleta de diversos esteroides animales y vegetales produce su conversión en compuestos con actividad de vitamina D (antirraquíticos). El clivaje de la unión carbono-carbono entre C9 y C10 es la alteración esencial producida por el proceso fotoquímico, pero no todos los esteroides que sufren este clivaje poseen actividad antirraquítica. La principal provitamina hallada en tejidos animales es el 7-dehidrocolesterol, que se sintetiza en la piel. La exposición de esta última a la luz solar convierte el 7-dehidrocolesterol en calciferol (Vit. D₃). Holick (1981), encontró un intermediario en la reacción de fotólisis, la previtamina D₃, un 6,7-cis isómero que se acumula en la piel después de la exposición a la radiación ultravioleta. (Ver figura n° 4, pag 13).

El ergosterol, que está presente en levaduras y hongos, es la provitamina de la vitamina D₂ o calciferol. El ergosterol y la vitamina D₂ difieren del 7-dehidrocolesterol y de la vitamina D₃, respectivamente, solo en que cada uno tiene una doble unión entre C22 y C23 y un grupo metilo en C24. (Ver figura n° 4, pag 13).

En algunas especies la potencia antirraquítica de las vitaminas D₂ y D₃ es muy diferente. En el hombre no hay prácticamente diferencia alguna entre ambas.

La vitamina D dietética, y la que se sintetiza intrínsecamente, requiere activación metabólica para poder ejercer sus acciones características sobre los tejidos efectores. En el hombre, el paso inicial de la activación de la Vit D₃ se produce principalmente en el hígado, y el producto resultante de este paso es el 25-hidroxicolecalciferol o calcifediol. El sistema de enzimas hepáticas responsables de la 25-hidroxilación de vitamina D no está totalmente caracterizado, pero está asociado con las fracciones microsomal y mitocondrial de los homogeneizados de hígado. Una vez sintetizado, el calcifediol entra en el torrente circulatorio, donde circula asociado a la globulina ligadora de vitamina D. La activación final a calcitriol se produce en el riñón, teniendo lugar la 1-hidroxilación del calcifediol por un sistema enzimático que es una oxidasa de función mixta (1- α hidroxilasa) y en el que están presentes el citocromo P-450, una flavoproteína, y la ferredoxina. (Ver figura n° 4, pag 13).

La enzima hidroxilante del calcifediol está sujeta a regulaciones dietéticas y

endocrinas que tienen gran importancia para la homeostasis del calcio. De este modo, la actividad de la hidroxilasa aumenta en las deficiencias dietéticas de vitamina D, calcio y fosfato y es estimulada por PTH, prolactina y estrógenos, e inhibida por una ingesta elevada de vitamina D. La lentitud de respuesta a algunos de estos agentes y su sensibilidad a los inhibidores metabólicos sugiere firmemente que las variaciones de actividad enzimática representan cambios en la cantidad de proteína enzimática renal. También hay pruebas de la existencia de un mecanismo agudo de control que pueda modificar la actividad de la hidroxilasa en pocos minutos. En el caso de la PTH es probable que intervenga en esta estimulación rápida el AMPc (Larkins et al., 1974; Rost et al., 1981). El modelo propuesto por Haussler y McCain (1977) abarca los principales conceptos que se han desarrollado en esta área. Existen pruebas de que la hipocalcemia pueda activar la hidroxilasa directamente, además de afectarla en forma indirecta al estimular la secreción de PTH (Fraser, 1980). La hipofosfatemia aumenta la actividad de la hidroxilasa, pero no se sabe si ello ocurre por efecto directo o indirecto (Haussler y McCain, 1977; Fraser, 1980; Rosen y Chesney, 1983). El calcitriol ejerce control del enzima por retroalimentación negativa, que pueda ser consecuencia de una acción directa sobre el tejido renal o de la inhibición de la secreción de PTH. No se conoce la naturaleza de los mecanismos reguladores de estrógenos y prolactina sobre la 1- α hidroxilasa.

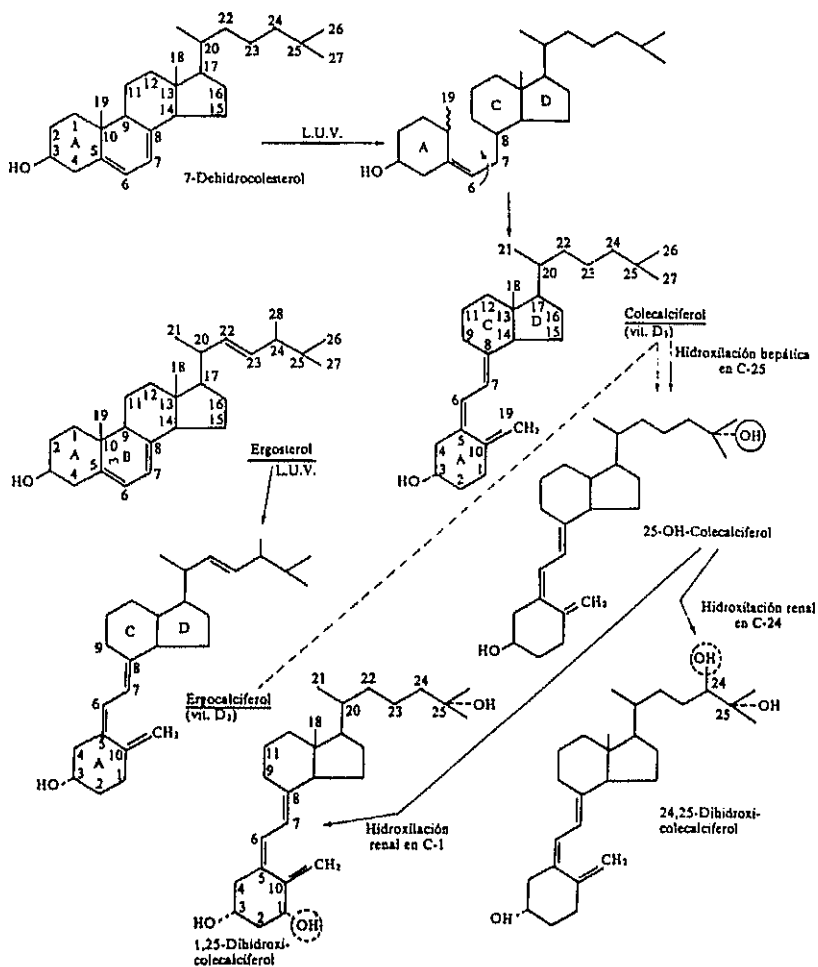


FIGURA 4.- Vitamina D y sus principales metabolitos. (Tomado de Prieto 1989).

Se acepta que el papel fisiológico fundamental de la vitamina D es el de asegurar los niveles plasmáticos de calcio y fosfatos necesarios para conseguir las condiciones favorables de mineralización del hueso, así como para mantener la homeostasis de la concentración plasmática de calcio. Esto se consigue mediante su acción a tres niveles: intestino, riñón y hueso.

A nivel intestinal, la Vit D₃ facilita la absorción de calcio y fosfatos en el intestino por aumentar el transporte transcelular a través de las células de la mucosa. Esta es la acción que se considera más importante para conseguir su objetivo, y la que ha sido mejor estudiada a nivel molecular. El transporte transcelular implica: a) La entrada de calcio por el borde en cepillo o membrana luminal de la célula; éste es un proceso de transporte facilitado, ya que es saturable y se realiza a favor de un gradiente de concentración. b) La salida de calcio por la membrana basolateral contra un gradiente electroquímico, merced a la acción de un enzima dependiente de adenosín trifosfato (ATP), es decir una ATPasa-Ca²⁺ dependiente y del sistema intercambiador Ca²⁺-Na⁺.

Existen dos hipótesis para explicar la acción de la hormona: a) La Vit D₃ se fija a receptores específicos citosólicos y, al igual que otras moléculas esteroideas, penetra en el núcleo en donde favorece la formación de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para sintetizar proteínas fijadoras de calcio. Estas proteínas actúan a nivel de la membrana luminal para facilitar la difusión transmembrana, y a nivel del citoplasma para facilitar el paso de calcio hasta los sistemas de transporte de la membrana basolateral. b) La hormona facilita la entrada de calcio antes de inducir la síntesis de proteínas fijadoras de calcio. A nivel de la membrana luminal, la hormona modifica su estructura lipídica y la velocidad de recambio de sus componentes, aumentando su fluidez y favoreciendo la velocidad de transporte para el calcio.

En el intestino el transporte activo de calcio y fósforo es virtualmente nulo en ausencia de Vit D₃, aunque excepcionalmente pueden difundir a través del intestino si el aporte dietético es bastante alto. Con un aporte exógeno de Vit D₃ el transporte activo de calcio y fósforo está aumentado.

Las acciones de la vitamina D en el hueso son complejas y en parte contrapuestas, porque si bien en ausencia de vitamina D aparece raquitismo y osteomalacia por desmineralización y formación de osteoide, la presencia excesiva provoca resorción del hueso con hipercalcemia y toxicidad tisular por exceso de calcio.

Existe pues, una acción consistente en facilitar la mineralización del hueso, la cual puede ser simple consecuencia del gradiente entre líquido intersticial y hueso; el papel de la vitamina D consistiría en asegurar este gradiente mediante su acción estimuladora de la

absorción en intestino y reabsorción en el túbulo renal de calcio y fosfato. En contraposición, la vitamina D tiene una acción resorptiva en hueso que se ve exagerada en el caso de intoxicación, pero que incluso puede ser activa en pequeño grado en condiciones fisiológicas. En el hueso existen también receptores específicos para la Vit D₃, y su acción va acompañada de aumento en la concentración de proteína fijadora de calcio. Su papel puede consistir en favorecer el sistema de transporte de calcio que permite la expulsión activa de calcio, contra un gradiente de concentración, desde el interior de la célula a través de la membrana luminal hacia la sangre.

A nivel renal, aunque hay datos contradictorios, se tiende a aceptar que la vitamina D facilita la reabsorción de calcio y fosfatos, al favorecer su reabsorción activa en el túbulo proximal. En lo que al fosfato se refiere, esta acción es inversa a la de la PTH.

De lo expuesto en la descripción de las acciones de PTH y vitamina D se desprende que el efecto neto de la PTH es aumentar el calcio y reducir el fosfato séricos, mientras que el de la vitamina D es elevar el calcio y los fosfatos. Al igual que ocurre en otros sistemas metabólicos, se aprecian mecanismos de autorregulación mediante los cuales se mantiene la homeostasis de calcio y fosfatos. El calcio es el principal regulador de la secreción de PTH; si aumenta el calcio la secreción de PTH disminuye, y viceversa. También el fosfato regula la secreción de PTH pero lo hace indirectamente, porque el aumento de fosfato, al formar complejos con el calcio, reduce la concentración de calcio ionizado y aumenta la secreción de PTH, la cual reducirá la concentración de fosfato. Así pues, este sistema de regulación sirve al efecto neto de PTH que es el de elevar el calcio sérico y reducir el de fosfato. Del mismo modo, tanto el calcio como el fosfato a niveles altos reducen la producción de 1,25(OH)₂D₃ en el riñón y aumentan la de 24,25(OH)₂D₃ por una vía alternativa de hidroxilación renal; el 1,25(OH)₂D₃ eleva el calcio y fosfatos séricos, pero el 24,25(OH)₂D₃ es mucho menos activo, lo que tiende a reducir y controlar el nivel sérico de estos iones.

En otro orden de interacción, se aprecia un reforzamiento mutuo entre la acción de la PTH y la vitamina D, ya que la PTH estimula la producción de 1,25(OH)₂D₃ en el riñón y puede reducir la de 24,25(OH)₂D₃. Finalmente, se requiere una plena interacción de ambas hormonas a nivel del hueso, de forma que la completa expresión de una exige la acción concurrente de la otra.

En lo que respecta a las características farmacocinéticas, de la vitamina D hay que señalar que se absorbe en el intestino delgado; los preparados hidroxilados lo hacen en tramos más altos y con mayor rapidez que el colecalciferol. La absorción requiere la presencia de sales biliares, estando reducida en casos de cirrosis biliar, o tras resecciones

de intestino, o en casos de enfermedad celíaca. La fijación de sales biliares con colestiramina reduce también la absorción de la vitamina D; en todos estos casos puede aparecer osteomalacia. La absorción también disminuye con la edad. Existe circulación enterohepática para la vitamina D y sus metabolitos.

En el plasma la vitamina D va fijada en su mayor parte a una globulina α denominada proteína fijadora de vitamina D, que tiene afinidad mayor por el derivado 25(OH)D₃ que por el colecalciferol o el derivado 1,25(OH)₂D₃. La vida media del 25(OH)D₃ es de 2-3 semanas en sujetos normales y de 6 semanas en anémicos, observándose el efecto máximo hacia los 15 días; la vida media del 1,25(OH)₂D₃ es de 5-8 horas, y su efecto máximo se observa a los 3 días.

El metabolismo de la vitamina D produce un gran número de metabolitos inactivos. La inactivación final del 1,25(OH)₂D₃ tiene lugar por hidroxilación renal en 24, formándose un compuesto el 1,24,25(OH)₃D₃. La hidroxilasa es la misma que hidroxila el calcifediol para formar 1,24(OH)₂D₃ y ambos compuestos 24 hidroxilados son menos activos que el calcitriol y presumiblemente representan metabolitos destinados a la excreción. También hay oxidación de cadenas laterales de calcitriol.

La vía primaria de excreción de la vitamina D es la biliar, y solo un pequeño porcentaje de una dosis administrada se encuentra en la orina. El exceso de vitamina D administrada se almacena en el tejido graso.

La excesiva administración de vitamina D produce un cuadro tóxico de hipervitaminosis que se suele ver más frecuentemente en niños tratados con dosis elevadas; pero también se aprecia en adultos. La dosis causante varía según la sensibilidad de cada individuo; suele establecerse alrededor de las 50000 U.I. o más diarias. Los primeros síntomas guardan relación con la hipercalcemia que origina: debilidad, cansancio, fatiga, náuseas, vómitos y diarrea. Hay afectación renal por poliuria, polidipsia, nocturia, pérdida de la capacidad de concentrar la orina y proteinuria. Puede haber deposición de calcio en tejidos blandos como riñón (nefrocalcinosis), vasos sanguíneos, corazón, pulmón. Su tratamiento requiere la supresión inmediata de vitamina D, dieta baja en calcio, glucocorticoides, infusión abundante de líquidos, furosemida, y tirocalcitonina.

También la aplicación excesiva de calcitriol y calcio en enfermos con osteodistrofia puede originar hipercalcurias, elevación del complejo iónico calcio-fósforo y precipitación de cristales en tejidos blandos (córnea, conjuntiva, etc.). Por ello es imprescindible que el índice (calcemia x fosfatemia) nunca pase de 70.

1.2.3. CALCITONINA. (CT).

Además de las fuentes generales de información ya señaladas para el apartado 1.2. vease como fuente bibliográfica sobre calcitonina Azria (1989), y Prieto (1989).

La CT es un polipéptido sintetizado en las células C del tiroides. Todas las moléculas conocidas de CT, desde la obtenida en peces hasta la procedente del tiroides humano, se componen de 32 aminoácidos, poseen un puente disulfuro entre las cisteínas 1 y 7 en su porción aminoterminal, y una prolinamida en el extremo C- terminal. (Ver figura nº 5 y Tabla I).

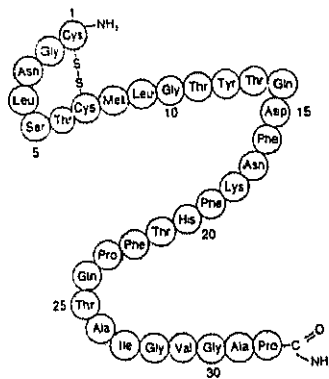


FIGURA 5.- Esquema de la secuencia estructural de la calcitonina humana. (Tomado de Vilardel 1988).

Tabla I

Secuencia de aminoácidos de algunas calcitoninas. (Tomado de Prieto 1989).

<i>Salmon:</i>	COOH -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂
<i>Anguila:</i>	COOH-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys Leu-Gln-Thr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂
<i>Bovina:</i>	COOH -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys-Asn-Leu-Asn-Asp Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH ₂
<i>Ovina:</i>	COOH -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys-Asp-Leu-Asn-Asp Tyr-His-Arg-Tyr-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH ₂
<i>Porcina:</i>	COOH -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn- Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH ₂
<i>Rata:</i>	COOH -Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Leu-Asn- Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ser-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂
<i>Humana:</i>	COOH-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn- Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂

Su secreción depende de la concentración de calcio en plasma: el aumento de calcio induce la síntesis y liberación de CT, mientras que la hipocalcemia reduce ambas. Varias sustancias son capaces de estimular la actividad de adenilciclasa y liberar CT, entre ellas el glucagón, prolactina, hormona tireoestimulante, gastrina, pancreozimina, y tiroxina. Se ha postulado que, después de las comidas, la gastrina induce la liberación de CT y así evita la hipercalcemia postprandial. La mujer tiene niveles basales de CT menores que el hombre, especialmente después de la menopausia, y responde a los estímulos de su secreción en menor grado.

La potencia o actividad de una CT (natural o sintética, o contenida en una preparación farmacéutica), se establece mediante bioensayo y se expresa en U (conocidas también anteriormente como unidades MRC debido a que se establecieron con el estándar biológico por el British Medical Research Council). Esta es ahora la única unidad reconocida oficialmente, aunque históricamente se han usado varias unidades diferentes. La valoración de la actividad biológica se realiza comparando la capacidad hipocalcémica de una CT con la CT porcina. Una U.I. equivale a la hipocalcemia producida en la rata por

0,01 mg de CT porcina o, lo que es lo mismo, 1 mg de CT porcina equivale a 100 U.I. La actividad biológica de la CT humana es semejante a la porcina, y la de salmón es entre 20 y 50 veces superior (probablemente por tener una vida media más larga y una mayor afinidad por los receptores en los órganos diana).

La potencia de los preparados de CT depende de su pureza. Esto es aplicable especialmente a las calcitoninas naturales, que pueden contener impurezas en forma de sustancia de baja actividad o inactiva, que atenúa su actividad y a veces causa efectos adversos. Por este y otros motivos es preferible expresar el contenido de un preparado en unidades de actividad que en peso de sustancia.

Parece ser que la actividad biológica de las calcitoninas depende de la integridad de la molécula tanto en su forma como en el tamaño (debe contener los 32 aminoácidos). No obstante no se ha identificado ningún lugar en la molécula específico de la actividad, aunque la actividad total depende en cierto modo de la presencia de un anillo de 7 residuos a nivel del N terminal. El puente disulfuro no es indispensable y puede abrirse o ser sustituido por otras formas de enlace. Por otro lado, algunos indicios sugieren que pueden realizarse modificaciones, bastante significativas en la estructura básica, sin demasiada pérdida de la actividad hipocalcemiante, al menos en el caso de la CT de salmón. Por ejemplo, cambios estructurales en la posición 8 y en el C terminal, y la introducción de yodo (la yodación es útil para el radioinmunoanálisis). Si bien la potencia de una CT de baja actividad, como por ejemplo la CT humana, puede mejorarse mediante la modificación de su estructura para hacerla más similar a una forma especialmente activa como es la CT de salmón, todavía no se ha producido un análogo sintético con una potencia mucho mayor a la de las calcitoninas naturales obtenidas de peces. Parece sin embargo haberse conseguido un "análogo superagonista" de la CT de salmón, probablemente 2-3 veces más potente.

La acción fundamental de la CT tiene lugar en el hueso, en donde inhibe el fenómeno de resorción y, como consecuencia, reduce los niveles circulantes de calcio, fósforo y péptidos que contienen hidroxiprolina. La inhibición de la resorción ósea se debe a la acción inhibitoria sobre la actividad del osteoclasto y, a la larga, a la reducción del número de osteoclastos. Su acción estimuladora sobre osteoblastos es, en cambio, más discutible. El efecto hipocalcemiante agudo es poco apreciable en el adulto normal en el que la resorción es lenta; pero se observa bien en el niño en el que hay una gran velocidad de recambio óseo, así como en la enfermedad de Paget.

La acción de la CT es inversa a la de la PTH; ambas tienen lugar a nivel óseo y ambas provocan estimulación de AMPc, pero es posible que se trate de compartimentos

de AMPc diferentes. Por supuesto, las dos actúan sobre receptores distintos. La CT previene y reduce la resorción ósea estimulada por la PTH, tanto "in vivo" como "in vitro".

En animales la CT es capaz de facilitar la excreción renal de calcio y fosfatos, y de aumentar la síntesis de Vit D₃, pero estas acciones no parecen tener importancia fisiológica en el hombre. Existen receptores de CT en el hueso, riñón, y mama; su significado en este último órgano puede tener relación con la regulación del contenido de calcio en la leche.

A dosis suprafisiológicas la CT reduce la secreción de gastrina y el contenido ácido en el estómago, y facilita la secreción de iones y agua en el intestino delgado.

La CT posee propiedades analgésicas cuando se administra en la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, y en algunos estudios se ha observado que puede facilitar la liberación de β -endorfina. Desde luego la analgesia que produce la CT en la clínica parece ser superior a la que cabría esperar de su estricta acción sobre el hueso.

En clínica se utiliza principalmente la CT de salmón que es 20 a 50 veces más potente que la humana. Se administra por vía parenteral ya que como es un péptido no se absorbe por vía oral y se inutiliza en el estómago. La biodisponibilidad por vía intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.) es del 70 %. Por vía s.c. la concentración máxima en plasma se alcanza a los 30 minutos, y desaparece de la circulación en unas 12 horas. La CT de salmón es la más resistente a la degradación; se metaboliza principalmente en el riñón, al igual que la CT humana. Su vida media es de unos 30 minutos por vía intravenosa (i.v.) y de 60-90 minutos por vía i.m.

Las principales reacciones adversas son las molestias gastrointestinales (nauseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal) que aparecen en el 10 % de los casos, trastornos vasculares con enrojecimiento de cara y manos, y dolor local en el sitio de inyección; la incidencia es menor con la CT de salmón que con la humana. Las molestias digestivas pueden prevenirse con benzamidas, y el enrojecimiento con indometazina.

Se desarrollan anticuerpos pero la CT de salmón mantiene su actividad biológica aún en presencia de un título elevado. Sin embargo en ocasiones es recomendable administrarla de forma interrumpida, por ejemplo 10 días de cada mes; con ello se consigue restablecer la sensibilidad.

1.3. IMPORTANCIA DEL CALCIO PARA LA CONTRACCION VASCULAR

El calcio es fundamental para la iniciación y mantenimiento de la actividad contráctil. Este hecho se conoce desde 1882, año en que Sidney Ringer (Ringer 1882),

comprobó que solo era posible obtener contracción en el corazón de rana aislado cuando el baño en que se encontraba el órgano contenía iones Ca^{2+} . En los años 50 Heilbrum (citado por Rasmussen 1970), de la Universidad de Pensilvania, demostró que la inyección de iones Ca^{2+} en las fibras musculares provocaba su contracción; y en 1970 Rasmussen atribuye a éste ión un papel fundamental para el buen funcionamiento de las células en general, (Rasmussen 1970). En el momento actual el ión Ca^{2+} puede considerarse un mensajero intracelular capaz de interactuar con proteínas intracelulares específicas, regulando así múltiples procesos funcionales y metabólicos de la célula. La concentración citoplasmática de ión Ca^{2+} se mantiene normalmente en valores muy bajos ($0.1-1\mu\text{M}$). Esto es debido a la extrusión del ión de la célula y a su secuestro dentro de las organelas celulares, particularmente mitocondrias, y retículo sarcoplásmico en células musculares. La teoría más aceptada para la activación del músculo liso implica un aumento de Ca^{2+} libre citoplasmático y la subsiguiente formación de un complejo calcio-calmodulina. Aunque existen diferencias entre los procesos contráctiles del músculo liso y del músculo esquelético, en ambos se acepta que para que tenga lugar la contracción debe existir una interacción similar entre la actina y la miosina. El deslizamiento de la actina y miosina se consigue a través de la unión de la zona globular de la miosina con la actina (es decir, la formación de puentes cruzados), flexionándose la cabeza de la miosina con respecto a la actina, seguido esto de la separación de ambas y posterior y rápida unión a un nuevo punto del filamento de actina. Este rápido ciclo de unión - separación de los puentes cruzados se considera como el responsable del desarrollo de la contracción - relajación del músculo liso, que depende de la energía procedente de la ruptura del ATP por una ATP-asa miosínica activada por la actina. En condiciones de reposo celular y con niveles bajos de Ca^{2+} intracelular los filamentos de actina y miosina se deslizan libremente sin formar puentes de unión y, por tanto no se produce contracción activa.

Cuando la concentración de Ca^{2+} alcanza un nivel umbral (aproximadamente $1\mu\text{M}$) el Ca^{2+} libre se une a una proteína específica de peso molecular aproximado 17000 - 18000 denominada calmodulina que cumple una función similar a la de la troponina C del músculo cardíaco. La calmodulina actuaría así como un receptor de calcio intracelular, que en determinadas condiciones, y sobre todo cuando aumenta la concentración de iones Ca^{2+} , se une a éstos. La calmodulina tiene cuatro sitios de unión para el Ca^{2+} y su concentración intracelular es variable, pero en realidad ésta no limita la velocidad enzimática, por lo que se deduce que la proteína se encuentra siempre en exceso. De los cuatro sitios de fijación que tiene la calmodulina para el Ca^{2+} , dos están unidos permanentemente al ión, y el tercero y posiblemente cuarto sean los encargados de captar

la entrada de iones Ca^{2+} en el músculo liso. De esta forma la calmodulina pasa de la forma inactiva a una forma activa de configuración nueva más compacta. Esta nueva forma activada se acopla a otro enzima que queda así a su vez activado produciendo la correspondiente respuesta. (Klee y Newton 1985).

En el caso de la contracción del músculo liso, sabemos que la miosina está compuesta por un par de cadenas pesadas (200000 d) y dos pares de cadenas ligeras (15000 d y 20000 d, respectivamente). Las cadenas ligeras de la miosina están localizadas en su extremo globular en el que se encuentran el sitio de fijación para la unión de la actina, y el sitio enzimático (miosina-ATPasa) que en respuesta a la activación del enzima hidroliza ATP. En el músculo liso la kinasa de la cadena ligera de la miosina se activa al unirse a la calmodulina activada, dando lugar a la fosforilación de un residuo específico de serina, situado en la cadena ligera de 20000 d de la miosina. Dicha fosforilación de la miosina parece ser imprescindible para la activación de la ATPasa miosínica por parte de la actina, y por tanto para la contracción. La kinasa de la cadena ligera de la miosina existe probablemente en dos subformas, de las que una es característica de la musculatura cardíaca estriada y de la musculatura esquelética, y la otra de la musculatura lisa. La defosforilación de la miosina está mediada por una fosfatasa Ca^{2+} -independiente. (Kamm y Stull 1985).

Las células musculares lisas se diferencian en múltiples aspectos de las fibras musculares estriadas cardíacas y esqueléticas. El esquema de la figura nº 6, (pag 23), muestra las principales características estructurales de los tres tipos de músculo.

Existen también diferencias funcionales importantes entre las células del músculo liso y las células musculares estriadas. Las fibras musculares lisas poseen un estado de reposo que no es claramente definible, ya que su potencial de reposo resulta difícil de estimar. Casi siempre la musculatura lisa se encuentra en estado de acortamiento parcial, con lo que pueden alternarse o añadirse aumentos prolongados del tono como consecuencia de la despolarización, con contracciones fásicas rápidas de carácter tetánico. La ordenación geométrica característica en la musculatura estriada de los filamentos de actina, no se puede tampoco encontrar en el músculo liso, existiendo también algunas diferencias en la interacción actina - miosina. El origen del calcio que se utiliza durante el proceso de contracción muscular difiere desde luego en distintos tipos de músculo, e incluso entre músculos similares pero de tejidos diferentes.

	musculo vascular liso	músculo cardíaco	músculo esquelético
placa motora terminal	ninguna	ninguna	sí
fibras	fusiformes cortas	ramificadas	cilíndricas largas
mitocondrias	pocas	muchas	pocas
núcleo celular/fibras	1	1	muchos
sarcómeros	ninguno	sí, máxima longitud 2.6 μ	sí, máxima longitud 3.65 μ
sincitio	sí (puentes)	sí (S. funcional)	ninguno
retículo sarcoplásmico	poco desarrollado	claramente desarrollado	intensamente desarrollado

FIGURA 6.- Características estructurales de las células de musculo vascular liso, musculo estriado cardíaco y musculo estriado esquelético. (Tomado con modificaciones de: Lossnitzer et al. 1983).

La contracción del músculo esquelético necesita esencialmente movilización de calcio intracelular, pero la del músculo liso requiere la entrada de calcio desde el exterior al interior celular. En realidad la contracción del músculo liso parece requerir calcio de ambas fuentes, extra e intracelular, y la participación de ambas fuentes de calcio puede variar dependiendo del tipo de estímulo que produzca la contracción. Aunque los estudios con vasos aislados se han llevado a cabo utilizando una variedad muy limitada de arterias, en principio han servido para proporcionar información suficiente a cerca de la utilización de calcio cuando se estimula el músculo liso vascular con distintos agonistas. Hay no obstante que señalar que existe una amplia diversidad en las características del músculo liso vascular de las células en diferentes arterias y en diferentes especies. Estas diferencias no se han estudiado sistemáticamente, pero la diversidad fisiológica y farmacológica en las respuestas de diferentes vasos se ha intentado correlacionar con diferencias en los receptores, y en la densidad de los mismos, en distintas arterias. Aunque las diferencias parecen en ocasiones caprichosas, es probable que las arterias cambien progresivamente

a medida que se ramifican; en parte por ser menores, y en parte porque abastecen un órgano en particular, y deben cumplir un papel circulatorio concreto. En esta revisión se citarán datos, que si bien corresponden a las arterias más utilizadas para estudios "in vitro", pueden servir para sentar las bases de la utilización de calcio en el proceso contráctil del músculo liso arterial.

Se acepta por tanto que el acceso del ión Ca^{2+} al interior celular es fundamental para el control de la contracción del músculo liso. El calcio extracelular se encuentra bien en forma libre o asociado a componentes específicos de la membrana plasmática; se especula que este último pudiera estar vinculado a ciertos receptores y que se movilizaría por estímulos específicos de la membrana.

Existen tres mecanismos básicos por los que el calcio puede acceder al interior del músculo liso, y más concretamente al interior del músculo liso vascular. En primer lugar existe una entrada pasiva que se debe a la existencia de un gradiente electroquímico favorable. Esto es lo que podríamos llamar una filtración de calcio en la que podría también incluirse la entrada de calcio a través de canales de sodio. Esta entrada de calcio es en realidad suficiente para producir contracción si el sistema de secuestro de calcio en el interior de la célula está comprometido de alguna forma (Loutzenhiser et al, 1985). En 1979 se propuso la existencia de otras dos vías de entrada de calcio. Estas son los dos tipos de canales de calcio: canales operados por potencial o voltaje dependientes (VOC) y canales operados por receptor o receptor dependientes (ROC) (Van Breemen et al, 1979, Bolton, 1979). La existencia de éstos dos diferentes sistemas de entrada para el calcio se sugirió en base a la aditividad en las respuestas máximas producidas por agonistas y por despolarización, y en base también a la observación de que por el contrario las respuestas máximas de contractilidad y de flujos de ^{45}Ca a distintos agonistas totales no eran aditivas. Los VOC se han investigado más gracias a la utilización de distintas técnicas electrofisiológicas. La activación de estos canales se realiza por estímulos despolarizantes como son las soluciones despolarizantes de potasio. Estos canales son especialmente sensibles a los denominados antagonistas y agonistas del calcio. Los antagonistas del calcio pueden dividirse, según su estructura química en dos grupos: inorgánicos y orgánicos. El cobalto (Co^{2+}), el níquel (Ni^{2+}), el lantano (La^{3+}), y el manganeso (Mn^{2+}) pertenecen al grupo de los inorgánicos, y si bien son antagonistas del calcio útiles para estudios de laboratorio, no pueden ser empleados clínicamente por su toxicidad. En cualquier caso su mecanismo de acción es bastante distinto del de los antagonistas del calcio orgánicos, ya que mientras éstos últimos modulan el funcionamiento de los canales de calcio VOC, los antagonistas inorgánicos podríamos decir que simplemente constituyen

un tapón físico para la entrada de calcio, pudiendo también interferir con la entrada pasiva de calcio.

La introducción de los antagonistas orgánicos del calcio en terapéutica es uno de los avances más notables de los últimos años. Su historia empezó hace unos veinte años cuando Albrecht Fleckenstein y sus colaboradores investigaban las propiedades de dos vasodilatadores coronarios la prenilamina y el verapamil. Estos compuestos además de producir la respuesta vasodilatadora coronaria esperada ejercían también un efecto inotrópico negativo sobre el corazón (Fleckenstein 1971). Los investigadores anteriormente citados descubrieron por casualidad que el calcio contrarrestaba el efecto inotrópico negativo de estos fármacos, y concluyeron que el inotropismo negativo era debido a la capacidad que el verapamil y la prenilamina tenían para bloquear la entrada de calcio inducida por la excitación. Podemos considerar ésta la génesis del término antagonistas del calcio. Según Fleckenstein para que un fármaco pueda ser considerado como tal debía reunir al menos estas dos propiedades: inhibir la corriente lenta del calcio de forma dosis-dependiente, y que esta inhibición pudiera ser revertida al administrar un exceso de calcio. En el momento actual el grupo de los antagonistas orgánicos del calcio abarca una serie de compuestos con un notable grado de heterogeneidad química (fenilalquilaminas, dihidropiridinas, benzotiazepinas, piperazinas o quinazolonas). Las dihidropiridinas son por el momento las más numerosas, y muchas de ellas muestran un alto grado de selectividad vascular, mostrando incluso algunas veces selectividad para determinados lechos vasculares. Mediante las sofisticadas técnicas recientemente desarrolladas se ha estudiado la modulación de los canales VOC por los antagonistas del calcio. Se han sondeado las características químicas de las zonas de unión (Vaghy et al 1987, a, b; Gloosman et al 1987, a, b), y dentro del grupo de las dihidropiridinas se han identificado también algunos fármacos que actúan en los canales VOC más aumentando que atenuando la entrada de Ca^{2+} (Schramm et al 1983 a, b). Estos son los llamados agonistas del calcio, a los que anteriormente ya nos hemos referido. Se ha presentado un modelo básico de canal de calcio VOC que tiene el interior hidrofílico, y que tiene un filtro de selectividad, un mecanismo de compuerta, y varios sitios reguladores. El filtro de selectividad está diseñado para admitir Ca^{2+} , y rechazar otros iones. Sin embargo no es probable que sea perfecto y podría permitir la entrada de iones Na^+ . La compuerta contiene probablemente una carga eléctrica variable y los sitios reguladores del canal se han identificado en ambas superficies de la membrana celular. Los grupos fosfato cargados negativamente y los grupos carboxílicos en la cara externa estabilizarían la membrana cuando se unen con Ca^{2+} y otros cationes polivalentes. Los antagonistas del calcio no compiten con el Ca^{2+} por sus lugares

de unión, pero se unen a lugares que interfieren con el mecanismo de compuerta. En realidad se necesita incluso Ca^{2+} y otros cationes polivalentes para que tenga lugar la unión de alta afinidad de nimodipina tritiada, nitrendipina tritiada, y otros antagonistas del calcio (Glossman y Ferry 1983, Schwartz y Triggle 1984). Parece que existen 3 lugares de unión para antagonistas del calcio: uno para las dihidropiridinas, otro para el verapamil, y otro para el diltiazem. Entre ellos existen interacciones alostéricas más que competitivas.

Tsien et al., comprobaron que los canales VOC en el corazón sufren transiciones al menos por tres estados: cerrado, abierto e inactivado, (Tsien et al. 1983). Después vuelven al estado cerrado otra vez. Las dihidropiridinas agonistas del calcio cuando se unen a los puntos de unión de dihidropiridinas cambian los canales hacia la posición de abiertos (Schram et al. 1983 a, b). Algunos fármacos como diltiazem y verapamil se unen preferentemente a los estados abierto e inactivado. Así la inhibición resulta más pronunciada cuantos más canales están inactivados. Esto puede ser beneficioso para la protección tisular en condiciones patológicas, ya que entonces las células dañadas tienden a estar más despolarizadas y muestran una mayor sensibilidad a los antagonistas del calcio.

Atendiendo a su distribución y a sus propiedades funcionales y farmacológicas, los canales VOC se pueden subclasificar, reconociéndose desde hace tiempo la existencia de 3 subtipos de canal: L, T y N. En el momento actual se acepta al menos la existencia de un cuarto tipo de canal VOC, los canales tipo P. Parece que todos los canales de calcio evolucionaron partiendo de un gen único ancestral, y la diversidad funcional ha emergido por duplicación de genes y por subsiguiente divergencia.

En el músculo liso vascular han sido sobretodo las técnicas de "parche de membrana" las que han ayudado en los últimos años a caracterizar los canales VOC.

En las células de aorta de rata (Friedman et al. 1985), y en las células de arteria mesentérica de conejo (Worley et al. 1986), se identificaron inicialmente dos tipos de corrientes de calcio, y se llegó a la conclusión de que en el músculo liso vascular existirían canales VOC de umbral bajo o tipo T, y canales VOC de umbral alto o tipo L, que son funcionalmente más importantes en la regulación del tono vascular, y que según Benham (1990), tienen propiedades similares a los canales L descritos primeramente en células cardíacas (Bean 1985).

Los canales tipo L son en realidad la clase de canal VOC mejor conocida y representan la forma más importante para la entrada de calcio en el corazón y en el músculo liso. Colaboran también en el control de la liberación de neurotransmisores desde células endocrinas, y algunas preparaciones neuronales. Los canales L pueden en realidad

existir también a nivel neuronal y en el momento actual se describen subtipos de canales L. Los L_n estarían situados en las neuronas, y los L_m estarían situados en el músculo (Miller 1987). Estos canales se definen como activados por voltaje alto y sensibles a 1-4 dihidropiridinas, y deben su nombre a la expresión "long lasting" (larga duración), o también "large Ba²⁺ conductance" (conductancia verdadera al Ba²⁺) (Nowicky et al. 1985). Su sensibilidad a las dihidropiridinas les distingue de los canales T, N y P, que son usualmente resistentes. Además de bloquearse por dihidropiridinas, se pueden bloquear también por antagonistas del calcio como verapamil o diltiazem, pero son insensibles a la toxina peptídica ω-conotoxina o toxina del caracol "Conus geographus". Existen también canales L en músculo esquelético que se activan mucho más lentamente que los de corazón, músculo liso y neuronas, presentando también diferencias con éstos en la conductancia y selectividad iónica. Precisamente en los canales tipo L del músculo esquelético es donde han empezado los estudios a nivel molecular. En éstos canales los receptores para dihidropiridinas son muy abundantes y en realidad el canal de calcio receptor de dihidropiridinas del músculo esquelético está compuesto de dos subunidades de peso molecular elevado, α₁ y α₂, más tres subunidades más pequeñas β, γ y δ.

En la figura nº 7 aparece la estructura del canal del calcio tipo L. La subunidad α₁ es la subunidad dominante que forma la estructura central del canal. Esta subunidad contiene los puntos de unión para los antagonistas del calcio y es susceptible de fosforilación por una quinasa AMPc-dependiente. La α₂ es una porción hidrofóbica altamente glucosada que no es susceptible de fosforilación. La β es una porción no glucoproteica que se une a nivel citosólico con la porción interna de la subunidad α₁ y que también es susceptible de fosforilación por una quinasa AMPc-dependiente. La γ es hidrofóbica, interactúa con la α₁ y contiene casi un 30% de hidratos de carbono.

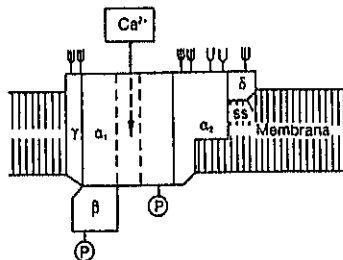


FIGURA 7.- Esquema propuesto para explicar la estructura molecular del canal de Ca. P: puntos susceptibles de fosforilación por una quinasa dependiente de AMPc. (Tomada de Catterall et al. 1989)

Tanabe et al., vieron que la subunidad α_1 mostraba una gran similitud con otros canales modulados por voltaje, particularmente el canal de Na^+ , (Tanabe et al. 1987). Es una cadena polipeptídica única con cuatro unidades repetidas (I-IV), cada una conteniendo seis espacios de membrana α -helicoidales numerados S_1 - S_6 . La zona comprendida entre las unidades II y III está implicada en el proceso de acoplamiento excitación-contracción (e-c) en el músculo esquelético. El cuarto segmento en cada repetición (S_4) contiene residuos con carga positiva en la 3ª o 4ª posición, y se piensa que forma parte de la maquinaria voltaje sensible. La subunidad α_1 parece bastar para la unión de fármacos (dihidropiridinas, verapamil y diltiazem). El lugar para la unión de las dihidropiridinas se ha localizado en un dominio citosólico adyacente a IVS_2 (Regulla et al. 1991). (Ver figura nº 8).

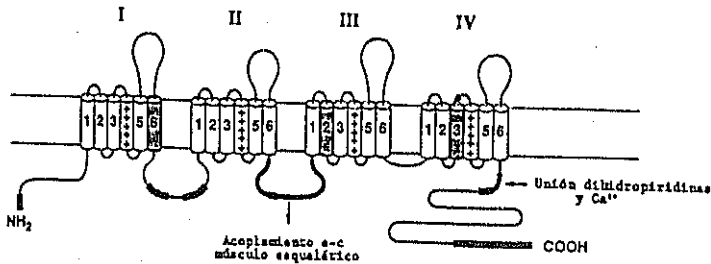


FIGURA 8.- Características estructurales de la subunidad α_1 del canal de calcio VOC. (e-c = excitación-contracción). (Tomado de Tsien et al. 1991).

En lo que respecta al canal T éste debe su nombre a la expresión "transient" (tránsito), o también "tiny Ba^{2+} conductance" (minúscula conductancia al Ba^{2+}) (Nowicky et al. 1985). Los canales del tipo T se conocen también como canales activados por bajo voltaje porque pueden abrirse con pequeñas despolarizaciones desde potenciales sostenidos relativamente negativos. Se han llamado también "rápidos", porque exhiben inactivación rápida y únicamente dependiente del voltaje. Se dice también que son lentamente desactivables, porque su cierre es relativamente lento después de una repolarización repentina.

El canal T se aisló primeramente en células de ganglios de raíz dorsal, y tiene una estructura similar al canal L, pero con mínimas alteraciones en la secuencia de aminoácidos de una de sus cinco subunidades. Son en general resistentes a dihidropiridinas y se encuentran en una gran variedad de células excitables y no excitables. La función más prominente de los canales de tipo T es sustentar actividad marcapasos, o entrada de calcio con potenciales de membrana negativos.

Los canales de tipo N se activan con voltaje alto pero difieren farmacológicamente de los canales tipo L por ser resistentes a las dihidropiridinas y por ser bloqueables por w-conotoxina. A menudo exhiben una conductancia de canal menor que los de tipo L, aunque la diferencia es menos acusada en mamíferos que en aves o anfibios. Muestran mayor tendencia a inactivarse, aunque su velocidad de inactivación es bastante variable. Están restringidos a las neuronas, variando mucho su cantidad en distintas neuronas. Son el mecanismo de entrada de calcio predominante en neuronas sensoriales simpáticas y neuronas del plexo mientérico, pero escasean en células de Purkinge cerebelares, y posiblemente también en células de los gránulos cerebelares. Es probable que en las neuronas corticales sean muy importantes, ya que en ellas la densidad en puntos de unión para la w-conotoxina es aproximadamente veinte veces mayor que la de puntos de unión para dihidropiridinas en el cerebro. La liberación de transmisores desde los sinaptosomas se reduce también mucho por la w-conotoxina, pero se afecta poco por las dihidropiridinas, lo que es consistente con la propuesta de que los canales tipo N podrían jugar un papel prioritario en la liberación de transmisores.

Los canales tipo P son una clase nueva de canales de calcio descubiertos por Llinas et al. (Llinas et al. 1989), activados por voltaje alto, que son particularmente prominentes en células de Purkinge cerebelares. Muestran una inactivación muy lenta y difieren de los canales tipo L en que son insensibles tanto a las dihidropiridinas, como a la w-conotoxina. Al menos en células de Purkinge cerebelares, y en terminales nerviosos del calamar gigante, los canales tipo P pueden bloquearse potentemente por FTX, un compuesto con bajo peso molecular que ha sido parcialmente purificado del veneno de la araña "Agelenopsis aperta".

El grupo de ShosaKu Numa (Mori et al. 1991) ha notificado la posible existencia de otros canales de calcio que ellos llaman BI. Estos canales BI son insensibles a nifedipina, e insensibles a la w-conotoxina, por lo que difieren de los L y los N. Los canales BI se inhiben por veneno de araña y aparecen en cantidades elevadas en cerebelo. Aunque se parecen en su distribución y propiedades farmacológicas a los de tipo P descubiertos por Llinas et al., presentan con éstos algunas diferencias funcionales. Así los de tipo P se

activan a potenciales mucho más negativos (> -60 mv) que los de tipo BI (> -10 mv) y éstos últimos se inactivan mucho más rápido. Los canales BI pueden además existir en dos isoformas: BI-1 y BI-2.

En lo que respecta a los canales ROC estos son menos selectivos para el calcio que los canales VOC. Existen pocos estudios sobre éstos canales de calcio. Sin embargo la mejor prueba de que los agonistas pueden abrir canales ROC en músculo liso es la observación de que pueden producir entrada de calcio en el músculo liso sin despolarización de la membrana. Pudo comprobarse que sucedía esto con la activación de aorta de conejo con noradrenalina (NA). Sin embargo la situación de los vasos de resistencia mesentéricos del conejo no parecía tan clara. Estos vasos se despolarizan en respuesta a NA y concentración alta de K^+ , lo que llevaría a concluir que la NA abre canales VOC en estos vasos. Sin embargo en 1985 Cauvin y Van Breemen, llegaron a la conclusión de que en los vasos mesentéricos de resistencia la apertura de los canales ROC sería el suceso primario cuando actúa la NA, y secundariamente a la apertura de los canales VOC tendría lugar una despolarización de la membrana, (Cauvin y Van Breemen 1985). Ahora bien, ¿porqué la NA despolarizaba los vasos de resistencia mesentéricos pero no la aorta?. Cabe pensar que cuando los agonistas inducen entrada de calcio sin despolarizar la membrana del músculo liso, esto se debería a una rectificación del aumento de permeabilidad a otros iones, como por ejemplo la corriente de salida de K^+ (Droogman et al. 1987). Es posible por tanto que en la aorta el flujo neto de carga inducido por NA a través de la membrana sea demasiado pequeño para despolarizarla. Por el contrario en los vasos de resistencia mesentéricos la NA produciría suficiente flujo neto de carga positiva (Ca^{2+} o Na^+). Una prueba adicional de la existencia de canales ROC distintos de los VOC fué el hecho de que la dihidropiridina BAY K 8644, que se comporta como agonista del calcio selectivo de canales VOC, era capaz de ocasionar un desarrollo de fuerza y una entrada de ^{45}Ca en anillos de aorta que se habían estimulado al máximo con NA, pero no lo era en los anillos activados antes con K^+ 80 mM. Por el contrario, la entrada máxima de ^{45}Ca estimulada por NA, histamina y serotonina, al igual que sus respuestas máximas, no eran aditivas. Esto indicaba que la activación de diferentes receptores podía ocasionar la apertura de canales ROC comunes. Por otra parte se sugirió que los dos tipos de canales de calcio, los ROC y los VOC podían utilizar componentes moleculares similares, y posiblemente ambos utilicen a la calmodulina en el proceso de transporte de calcio, ya que el inhibidor de calmodulina trifluoperazina inhibe con igual potencia el flujo de ^{45}Ca estimulado por NA 10^{-5} M o estimulado por K^+ 80 mM (Cauvin y Van Breemen 1985).

Los canales ROC se pensó que eran importantes en la hipertensión desde que

Mulvany et al. vieron que la resistencia vascular de ratas espontáneamente hipertensas muestra mayor sensibilidad al calcio en presencia de NA que la de animales control, (Mulvany et al. 1980 a, b). Esta diferencia en la sensibilidad al calcio no se apreció sin embargo, en presencia de altas concentraciones de potasio. Se ha comprobado también que la NA aumenta la entrada de ^{45}Ca en vasos de resistencia de ratas espontáneamente hipertensas en mayor medida que en los vasos de resistencia de ratas control normotensas (Cauvin et al. 1986). El antagonista del calcio nisoldipina es además menos potente sobre los flujos de calcio de vasos de resistencia en ratas espontáneamente hipertensas en presencia de NA que en ratas normotensas control (Cauvin y Greater 1986). Todos estos datos, podrían sugerir que existiesen cambios en las características del canal ROC en la hipertensión espontánea.

Existen diferencias en las fuentes que aportan el calcio si consideramos los dos mecanismos para producir contracciones en el músculo liso arterial: la despolarización y la activación por agonistas.

Una de las preparaciones más utilizadas para estudios "in vitro", son los anillos de aorta de conejo. Estos se activan totalmente con la concentración 80mM de ClK o bien con NA 10^{-5}M . La contracción inducida por K^+ se ha visto que estaba compuesta del desarrollo de una contracción rápida y potente (respuesta fásica), y el desarrollo subsiguiente de una fase de contracción sostenida (respuesta tónica). En algunos tejidos vasculares la clarificación de ambos componentes de la respuesta parece difícil, pero en las preparaciones de anillos de aorta de conejo pueden apreciarse fácilmente. Ambos parecen deberse fundamentalmente a la entrada de calcio extracelular, y se inhiben con antagonistas del calcio; si bien las respuestas tónicas se inhiben más que las fásicas, existiendo en este caso una inhibición claramente de tipo competitivo (Flein y Zelis 1982; Fleckenstein 1983; Itoh et al. 1984). En 1963 se había comprobado que la NA también producía respuestas bifásicas en aorta de conejo, pero en éste caso la primera parte de la respuesta contráctil (respuesta rápida), podía incluso deprimirse elevando la concentración de calcio en el medio extracelular, y era precisamente el componente de respuesta lenta el que quedaba inhibido al disminuir la concentración de calcio en el medio (Bohr 1963). Más tarde se comprobó que la respuesta contráctil del músculo liso arterial a un número elevado de agonistas fisiológicos, no está mediada solo por el estímulo de la entrada de calcio, sino también por la liberación del calcio unido intracelularmente. Así en el músculo liso arterial, los neurotransmisores y autacoides pueden producir todavía una contracción transitoria después de remover el calcio extracelular con etilen-glicol(β -aminoestileter)tetraacetato (EGTA), o después de inhibir la entrada de calcio con La^{3+} , o con

antagonistas orgánicos del calcio (Van Breemen y Deth 1976; Deth y Van Breemen 1977a, b; Deth y Casteals 1977; Karaki et al. 1979). Con éste criterio los anteriores autores demostraron que la NA, la histamina, y la angiotensina II, liberaban calcio de un almacén común. Este almacén deba rellenarse con el calcio extracelular de forma que debe estar localizado cerca del sarcolema.

Aunque se ha sugerido que la cara interna de la membrana plasmática libera calcio durante la estimulación del músculo liso (Debass et al. 1975), esta fuente de calcio representa únicamente una mínima parte del calcio que se libera en el interior celular. La principal fuente de calcio intracelular es sin lugar a dudas, el retículo sarcoplásmico. Su existencia en músculo liso pudo demostrarse con estudios ultraestructurales ya en 1971 (Somlyo et al. 1971), y más tarde pudo comprobarse que esta estructura era capaz de acumular calcio en un rango milimolar (Somlyo et al. 1982). Los trabajos de Saida con preparaciones en las que la membrana se destruye mediante tratamiento con saponina, prueban la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico en músculo liso, (Saida 1981; Saida y Nonomura 1981; Saida 1982). En realidad tanto en el retículo sarcoplásmico superficial, como en el retículo sarcoplásmico profundo del músculo liso vascular, se ha demostrado la existencia de concentraciones relativamente altas de calcio que pueden liberarse por NA o por cafeína (Bond et al. 1984; Kowarski et al. 1985). Esta liberación podría explicarse como consecuencia de una despolarización de la membrana del retículo sarcoplásmico, pero los mecanismos que la inducen no se han clarificado totalmente.

El fenómeno de liberación de calcio inducida por calcio se observó por vez primera en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético desprovisto de membrana (Endo et al. 1970; Ford y Podolski 1970). Subsiguientemente se observó en el músculo cardíaco desprovisto de membrana (Fabiato y Fabiato 1972), y posteriormente pudo también demostrarse un fenómeno similar en el músculo liso desprovisto de membrana. Así se comprobó que en el músculo liso la velocidad de captura de calcio por el retículo sarcoplásmico aumentaba gradualmente a medida que aumentaba la concentración de calcio en la solución del baño, pero sin embargo si esta era $10^{-5}M$ la cantidad de calcio que almacenaba el retículo sarcoplásmico era menor que si la concentración de calcio en la solución del baño era $10^{-6}M$ (Saida 1982). Esto indicaba que con la concentración $10^{-5}M$ en el baño existía una liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico además de una captura. En realidad en fibras aisladas de músculo liso de arteria mesentérica tratadas con saponina, se ha podido demostrar que cantidades de calcio en el interior celular iguales o superiores a $2 \times 10^{-6}M$, pueden también liberar calcio del mismo depósito intracelular desde donde se libera por cafeína, y ésta liberación puede servir también para producir una

contacción. El AMPc potencia esta contracción, y potencia también la respuesta inicial a NA. Sin embargo, el AMPc muestra también un segundo efecto, por el cual estimula la captura de calcio en el retículo sarcoplásmico. Este segundo efecto rápidamente domina sobre el efecto inicial, resultando una reducción neta en el componente tónico de la contracción (Saida y Van Breemen 1984a, b). Si consideramos los dos mecanismos básicos para producir contracciones en el músculo liso, podemos decir que durante la activación por agonistas existe una liberación de calcio inducida por calcio, pero ésta no existe durante la despolarización del músculo liso. Veremos que es lo que sucede en ambos casos.

En aorta de conejo inicialmente se señaló que NA y cafeína liberaban calcio del mismo depósito intracelular (Deth y Casteels 1977). Ahora bien, hay que considerar que si bien NA y cafeína parecen liberar calcio de un depósito común, no lo liberan del mismo modo. En arteria mesentérica de conejo la NA puede inducir una contracción submaximal cuando se aplica en concentración $10^{-5}M$ después que el músculo se ha tratado con EGTA, pero después de esta primera contracción la aplicación nuevamente de NA no induce una segunda contracción. Una aplicación de cafeína 25mM después de la primera administración de NA todavía induce contracción, pero después de una única administración de cafeína 25mM al músculo, el calcio del retículo sarcoplásmico aparentemente se agota, y no puede obtenerse respuesta con la aplicación subsiguiente de NA o cafeína (Saida y Van Breemen 1984a, b). Estos resultados pudieran explicarse parcialmente asumiendo que ambas, cafeína y NA, liberan calcio de un almacén común, pero la cafeína lo libera de forma más efectiva. Teniendo en cuenta que la NA $10^{-5}M$ podría liberar solo parte del calcio almacenado, resultaba de todos modos difícil de explicar que fuese imposible obtener contracciones cuando nuevamente se administraba NA. Se llegó incluso a establecer la existencia de dos almacenes distintos de calcio para NA y cafeína. Estudios subsiguientes determinaron que la liberación y reposición de calcio es mucho más rápida en el almacén sensible a NA, que en el retículo sarcoplásmico sensible a cafeína. Se llegó a establecer que el almacén sensible a NA era tan pequeño que no contribuía directamente a la activación de los miofilamentos; sin embargo cuando el calcio se libera de este depósito por actuación de los agonistas, promueve la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico. Podríamos decir que en el músculo liso arterial la despolarización abre canales VOC en la membrana plasmática, y libera calcio de la cara externa de la membrana. La NA interacciona con receptores α para abrir canales ROC distintos de los VOC, y también libera calcio en la superficie externa, pero adicionalmente libera calcio de la cara interna de la membrana plasmática, y éste a su vez induce la liberación de calcio

desde el retículo sarcoplásmico. En cualquier caso, la contracción que induce la liberación de calcio que NA promueve estaba directamente correlacionada con la cantidad de calcio presente en el retículo sarcoplásmico. (Van Breemen et al. 1986).

Hemos visto que en la contracción inducida por un agonista el aumento de la entrada de calcio va asociado a la liberación de calcio desde la cara interna de la membrana plasmática, y así existiría suficiente calcio libre para que tuviese lugar un fenómeno de liberación de calcio inducida por calcio. Otra explicación podría ser que después de la ocupación del receptor existiese una implicación del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico; pero esto no sucedería durante la despolarización de la membrana. El IP_3 se propuso en 1953 como mensajero intracelular (Hokin y Hokin 1953), y en 1984 se comprobó que el IP_3 liberaba calcio del retículo endoplásmico de las células acinares del páncreas (Berridge 1984). Más tarde se pudo demostrar que el IP_3 causa también liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico de células aisladas de músculo liso de arterias coronarias porcinas (Suematsu et al. 1984; Yamamoto y Van Breemen 1985). Con la ocupación de un receptor por el agonista se activa la fosfolipasa C, y este enzima cataliza la rotura del fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) para producir el compuesto activo IP_3 que libera calcio desde el retículo sarcoplásmico. El PIP_2 es entonces regenerado por el ciclo del fosfatidil inositol (Williamson et al. 1985). Más tarde ha podido demostrarse que en el músculo liso vascular desprovisto de membrana el IP_3 es capaz de producir contracción si el retículo sarcoplásmico se ha llenado previamente de calcio. Concretamente en células de aorta de rata el IP_3 causa una mayor liberación de calcio (alrededor del 90% de la captura de calcio ATP dependiente) que la liberación que causan dosis máximas de cafeína (alrededor del 50% de la captura de calcio ATP dependiente). La liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico es sin lugar a dudas más rápida con IP_3 , y además la respuesta de liberación por IP_3 es totalmente insensible a procaina, mientras que la liberación de calcio inducida por calcio, o inducida por cafeína se bloquean por procaina. Por éstos motivos, Johns et al. proponen que el retículo sarcoplásmico del músculo liso, además de una salida de calcio no regulada, tiene dos tipos de canales de calcio excitables, uno se activaría por IP_3 y el otro se activaría por calcio o cafeína, (Johns et al. 1987).

Hemos visto que el aumento de calcio intracelular que causa un agonista es capaz de producir contracción. Durante la contracción producida por despolarización se ha sugerido que el calcio intracelular podría no alcanzar suficiente concentración para inducir a su vez liberación de calcio desde los depósitos. Esto sucedería así porque el K^+ no causaría liberación de calcio desde la cara interna de la membrana plasmática. Cuando

existe un incremento moderado en la entrada de calcio, parece que ésta puede ser secuestrado por el retículo sarcoplásmico antes de que tenga lugar un aumento del calcio intracelular. En 1977 Van Breemen ya señaló que el desarrollo de fuerza en el músculo liso vascular no es solo función de la cantidad de calcio que entra en las células, sino también de la velocidad a la cual tiene lugar este proceso de entrada de calcio (Van Breemen 1977). Así, cuando se introduce rápidamente una cierta cantidad de calcio en las células musculares de la aorta de conejo durante un periodo corto de tiempo, se produce una contracción mayor y más rápida que cuando la misma cantidad de calcio entra más lento durante un intervalo mayor. Esto sugirió que cuando el calcio entra en las células, el retículo sarcoplásmico superficial remueve una fracción variable del calcio que acaba de entrar desde el área cercana a la cara interna de la membrana plasmática. Durante la despolarización con K^+ pudo demostrarse que el retículo sarcoplásmico en realidad acumula calcio (Loutzenhiser y Van Breemen 1983a, b; Leigten y Van Breemen 1984). Los estudios con BAY K 8644 también señalaron la importancia del retículo sarcoplásmico en la captura de calcio cuando éste penetra en la célula. Este compuesto se sabe que abre los mismos canales que la despolarización con altas concentraciones de K^+ (Yamamoto et al. 1984), y puede en concentraciones bajas promover la entrada de una cantidad apreciable de calcio induciendo un desarrollo mínimo de fuerza. La escasa actividad contráctil de BAY K 8644 podría deberse a la rápida extrusión del calcio por la célula previniendo así su acumulación intracelular, o podría también ser debida al traslado del calcio que había entrado en la célula a un depósito intracelular. En 1985 Hwang y Van Breemen comprobaron que el calcio captado por las células de aorta de conejo en presencia de BAY K 8644 se acumulaba en un depósito del que podía liberarse por cafeína (Hwang y Van Breemen 1985). En realidad el flujo de calcio estimulado por BAY K 8644 produce una elevada acumulación de calcio intracelular que puede revertirse con la aplicación de cafeína 50 mM, y se llegó a la conclusión de que el calcio que entraba en las células a una velocidad submaximal podía acumularse en el retículo sarcoplásmico antes de alcanzar los miofilamentos en las regiones más próximas de la célula. (Van Breemen et al. 1985). En otras palabras, además de la membrana plasmática existiría una segunda barrera para la entrada de calcio al citoplasma; dicha barrera actuaría removiendo el calcio que acaba justo de entrar por los canales de calcio de la membrana plasmática, y podría considerarse constituida por el transporte activo de calcio en el retículo sarcoplásmico superficial, y quizá también por bombas de calcio existentes en las porciones caveolares de la membrana plasmática. Esta barrera podría ser el sistema mejor para controlar las concentraciones de calcio activas en células pequeñas con una alta relación superficie/volumen.

Sabemos que incluso en condiciones de reposo existe una entrada significativa de calcio a través de la membrana del músculo liso. El mantenimiento de esta barrera de secuestro requiere por tanto una descarga continua del calcio en exceso desde este sistema al exterior de la célula, manteniéndose así siempre la capacidad del retículo sarcoplásmico para modular la concentración citoplasmática de calcio. Esta descarga continua de calcio desde el retículo sarcoplásmico podría tener lugar a través de áreas de unión especial entre la membrana y el retículo sarcoplásmico. Es concebible que la producción basal de IP_3 sea capaz de permeabilizar preferentemente el retículo sarcoplásmico en esas áreas porque la IP_3 -fosfatasa lo hidrolizaría antes de que difundiese a otro lugar. (Johns et al. 1987). En la aorta de conejo se sabía que durante la relajación celular también el calcio es captado por el retículo sarcoplásmico antes de ser extraído de la célula (Van Breemen et al. 1980). Existiría por tanto un equilibrio dinámico para el calcio del músculo liso. El calcio entra a través de canales ROC o VDC, o bien entra por una entrada pasiva, y cuando la concentración intracelular excede de $10^{-7}M$ los miofilamentos se activan. El calcio intracelular es subsiguientemente expulsado al espacio extracelular interviniendo al retículo sarcoplásmico. Esto permitiría al enorme gradiente de calcio a través de la membrana crear dentro de la célula un gradiente de calcio menor.

Podemos por tanto decir que el retículo sarcoplásmico superficial absorbe el calcio que acaba de entrar en la célula. Si el retículo sarcoplásmico se depleta y la velocidad de entrada de calcio es lenta, puede remover virtualmente todo el calcio, antes de que pueda unirse a la calmodulina para activar los miofilamentos. La entrada de calcio inducida por una concentración alta de K^+ no conduce al desarrollo de fuerza hasta que el depósito superficial de calcio esté lleno hasta su nivel fisiológico. Cuando este umbral se hubiese superado, la entrada de calcio estimulada por despolarización induciría tensión. Después de depletar con NA el depósito de calcio, existe como es lógico un retraso mayor para la contracción por K^+ 80 mM, y éste produce una contracción lenta. Por otra parte como es lógico, la contracción por CIK se acelera en presencia de un agonista capaz de liberar calcio del almacén intracelular. Por todo ello se llegó a establecer que el almacén de calcio liberable por los agonistas es el mismo capaz de captar calcio cuando se produce una despolarización de la membrana. (Van Breemen et al. 1985; Johns et al. 1987).

Habría por tanto una diferencia cualitativa entre la entrada de calcio estimulada por despolarización con concentraciones elevadas de K^+ , y la entrada de calcio estimulada por los agonistas que son capaces a su vez de liberar calcio intracelular. Una fracción del calcio que entra por estímulo con CIK se desviaría para incorporarse en el lugar de almacén intracelular de calcio, y no sería por tanto útil para la activación. Sin embargo durante la

estimulación con un agonista, la ocupación del receptor causa un descenso en la capacidad del almacén para secuestrar calcio, permitiendo que más cantidad del calcio que entra se utilice en la activación del aparato contráctil. Habría por tanto dos formas de conseguir una activación del músculo, es decir dos formas de rebasar esta barrera sobrepasando la capacidad amortiguadora del retículo sarcoplásmico superficial. En primer lugar esto sucedería cuando el estímulo de NA o de otros agonistas inhiben la acumulación de calcio en el retículo sarcoplásmico, y en segundo lugar esto también sucedería si la apertura de canales de calcio aumenta su entrada por encima de cierto umbral, saturándose entonces las bombas de calcio del retículo sarcoplásmico.

Como bien sabemos el tono del músculo liso arterial depende fundamentalmente de la actividad adrenérgica. Parece por ello adecuado completar ésta revisión señalando las diferencias que existen en la utilización del calcio cuando se produce vasoconstricción por estímulo de distintos adrenoreceptores vasculares.

La división de los receptores adrenérgicos en receptores α y β se debe a Ahlquist, quien tras un estudio con adrenalina (A), NA, e isoproterenol propuso la existencia de éstos dos tipos de receptores basándose en la distinta sensibilidad a los compuestos en estudio (Ahlquist 1948). Los receptores β se subdividieron en β_1 y β_2 (Lands et al. 1967), según su localización en tejido cardíaco, o en músculo liso y células glandulares respectivamente. Estos receptores β fueron los primeros estudiados debido a los efectos terapéuticos que mostraron los bloqueantes β en la hipertensión, angina de pecho, e isquemia de miocardio. Fué sin embargo ya en la década de los 70 cuando se iniciaron los estudios sobre los receptores α , y Langer los clasificó, por analogía con los β , en α_1 y α_2 , señalando inicialmente que los α_1 se localizaban a nivel postsináptico, y los α_2 a nivel presináptico. (Langer 1974). Más tarde distintos autores, y entre ellos el mismo Langer (Langer 1981; Starke 1981; Timmermans y Van Zwieten 1981, 1982), proponen que el término pre o postsináptico indica únicamente la localización anatómica del receptor respecto a la neurona y a la sinápsis, y los receptores pueden clasificarse como α_1 o α_2 por su afinidad hacia determinados agonistas o antagonistas independientemente de su localización anatómica.

En los vasos los receptores postsinápticos son de ambos subtipos α_1 y α_2 , en una proporción muy aproximada de 1:1, produciendo el estímulo de ambos vasoconstricción. La localización de los dos subtipos de receptores postsinápticos vasculares respecto a la propia sinápsis es sin embargo distinta. El receptor postsináptico α_1 está localizado intrasinápsis, en contacto con los nervios noradrenérgicos, siendo de ésta forma muy accesible al neurotransmisor NA. En el caso de que el órgano diana sea una arteria, su

posición anatómica se corresponde con la adventicia. El receptor postsináptico α_2 se localiza más alejado de la zona de sinápsis, y en el caso de las arterias, en la túnica íntima (Langer y Shepperson 1982; Van Zwieten 1986). (Ver figura nº 9).

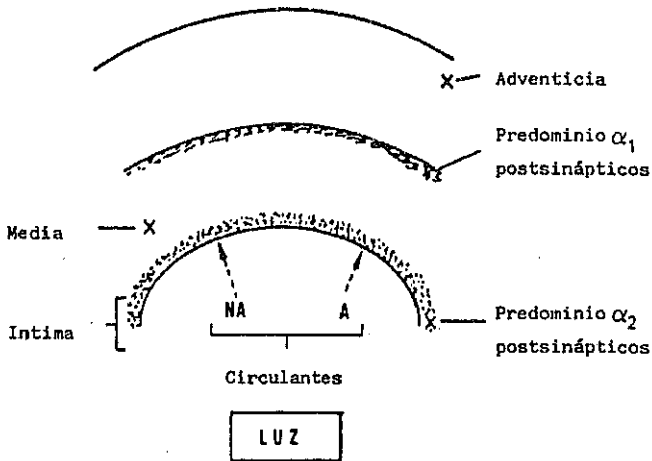


FIGURA 9.- Representación esquemática de las diferentes localizaciones en que se encuentran los receptores postsinápticos α_1 y α_2 en el músculo vascular liso. (Tomada de Van Zwieten, 1986).

Los estudios sobre utilización de calcio extracelular en la vasoconstricción mediada por agonistas α_1 y α_2 se han llevado a cabo fundamentalmente en la preparación de "pithed rat" (rata descerebrada y desmedulada). En ella el efecto vasopresor de los fármacos es lógicamente sólo consecuencia de sus acciones periféricas. Los resultados del grupo de Van Zwieten y Timmermans con antagonistas del calcio en animales descerebrados, señalaron que las respuestas obtenidas por activación de receptores α_2 vasculares eran sensibles a la inhibición de la entrada del calcio extracelular, pero la participación del calcio extracelular en la vasoconstricción por estímulo α_1 podía variar para distintos agonistas (Van Meel et al. 1981 a, b; Van Meel et al. 1982; Van Zwieten et al. 1982, 1984, 1985;

Timmermans et al. 1983 a, b, c, 1984; Van Zwieten y Timmermans 1984; Wilffert et al. 1984 a, b; Van Zwieten 1986; Timmermans y Thoolen 1987; Timmermans et al. 1987a, b). Para éstos investigadores la utilización de calcio por agonistas α_1 podía tener claramente un doble origen: la entrada de calcio extracelular sensible a los antagonistas del calcio, y la movilización del calcio intracelular insensible a éstos fármacos. Estos investigadores consideraron "agonistas totales" a aquellos agonistas α_1 con elevada actividad intrínseca que producían una vasoconstricción insensible al bloqueo de los canales VOC, y clasificaron como "agonistas parciales" a los agonistas α_1 que podían resultar sensibles a los antagonistas del calcio (Timmermans et al 1983 b, c; Van Zwieten et al. 1985; Timmermans et al 1987 a, b). Algunos investigadores han propuesto que podría existir una heterogeneidad de receptores α_1 , y según el tejido considerado podría variar el modo en que se activan estos receptores, y también la movilización del calcio cuando se estimulan. Para Han (Han et al. 1987), existirían dos subtipos de receptores α_1 que causarían respuestas contráctiles a través de mecanismos moleculares distintos. Un subtipo estimularía la formación de derivados de IP_3 , y causaría contracción con independencia del calcio extracelular; el otro subtipo de receptor α_1 no estimularía la formación de derivados de IP_3 , y causaría contracción dependiente de la entrada de calcio a través de canales dihidropiridina sensibles. Se ha especulado también que podían existir receptores α_1 de reserva. Estos receptores α_1 de reserva entrarían en juego cuando se administran los antagonistas del calcio, y servirían para amortiguar su efecto (Reid et al. 1983; Hamilton et al. 1983; Ruffolo y Yaden 1984; Ruffolo et al. 1984; Nichols y Ruffolo 1986). En la circulación arterial podrían existir una gran cantidad de receptores α_1 postsinápticos vasculares de reserva, pero no existirían sin embargo, receptores α_2 postsinápticos de reserva.

Múltiples estudios "in vitro" han confirmado que la utilización del calcio intracelular es esencial para la contracción vascular inducida por estímulo α_1 . Chiu et al. (Chiu et al. 1986 a), comprobaron que en aorta de rata la eficacia de un agonista α_1 para producir efecto contráctil podía depender aún más de su capacidad para activar la liberación de calcio intracelular, que de su capacidad para estimular la entrada de calcio extracelular. Estos mismos autores comprueban que en ésta preparación, al igual que sucede "in vivo", la capacidad de los agonistas α_1 para utilizar fuentes de calcio intra o extracelulares podía variar con cada agonista. La forma en que un agonista interactúa con los receptores α_1 vasculares determinaría que proceso es activado, y hasta que punto. Sin embargo para contraer la aorta de rata un agonista total como es NA requeriría siempre la activación de ambos procesos, promoviendo necesariamente la entrada de calcio extracelular así como

la liberación del calcio intracelular (Chiu et al 1986 b). Así pues, en ésta preparación la contracción inducida por estímulo α_1 invariablemente se acompaña de entrada de calcio, y en ella no se ha identificado aún un agonista capaz de provocar contracción por estímulo α_1 que resulte insensible a los antagonistas del calcio.

Hasta la fecha no ha sido sin embargo fácil demostrar en los estudios "in vitro", la importancia que tiene el calcio extracelular para la contracción vascular mediada por estímulo α_2 . En realidad hay que señalar que hasta éste momento ni siquiera ha sido fácil demostrar la participación de los receptores α_2 en las contracciones inducidas en arterias aisladas por distintos agonistas. Para justificar ésto se ha sugerido que en las venas podrá existir mayor densidad de receptores postsinápticos α_2 que en las arterias.

Los adrenoceptores de aorta de rata inicialmente se describieron como un subtipo aberrante de adrenoceptor α , que combinaba características de ambos subtipos de receptores, los α_1 y los α_2 , sin pertenecer claramente a ninguno de éstos subtipos (Ruffolo et al. 1980, 1981, 1982; Randriantsoa et al. 1981). Hoy en día en la mayoría de las arterias aisladas el estímulo de los receptores α se considera debido al estímulo α_1 , y en la aorta de conejo se sabe que la contracción inducida por NA se debe fundamentalmente al estímulo de éste subtipo de receptor. El escaso efecto contráctil que muestran en ésta preparación los agonistas α_2 selectivos, tales como el compuesto B-HT 920, parece deberse también al estímulo α_1 (Lues y Schüman 1984; Bou y Massingham 1986). Más recientemente sin embargo, Sulpizio y Hieble comprueban que este compuesto es capaz de producir contracciones consistentes en arteria safena canina aislada en presencia del agonista del calcio BAY K 8644, y las respuestas así obtenidas eran para estos autores indudablemente inducidas por estímulo α_2 postsináptico, ya que se inhibían cuando se bloqueaban estos receptores con rawolscina, y no se modificaban con el bloqueo de receptores α_1 con prazosín, (Sulpizio y Hieble 1987). Estos datos obtenidos "in vitro" ponen nuevamente de manifiesto la importancia del calcio extracelular para la vasoconstricción por estímulo de receptores α_2 . No obstante se necesitarán más estudios para establecer definitivamente los mecanismos de utilización de calcio que acompañan la vasoconstricción α_1 y α_2 . La clarificación de los mismos podrá posiblemente ayudar en un futuro a determinar el papel que ambos receptores juegan en el mantenimiento del tono arterial, y podría posiblemente incluso llegar a justificar la distribución de estos receptores a lo largo del árbol vascular arterial.

1.4. HIPOCALCEMIAS

Además de las fuentes generales de información utilizadas para los apartados 1.1. y 1.2., ver para éste apartado Montoliú (1988).

1.4.1. CAUSAS DE HIPOCALCEMIA

Como el calcio circulante se halla en gran parte unido a la albúmina, la hipocalcemia se acompaña de una disminución de la calcemia. Sin embargo en este caso, el calcio iónico se mantiene normal y no se producen síntomas.

El hipoparatiroidismo es una de las causas más frecuentes de hipocalcemia crónica. Actualmente, el hipoparatiroidismo es secundario en la mayoría de los casos a lesiones quirúrgicas de las paratiroides producidas durante intervenciones de tiroides, de neoplasias laríngeas, etc. Tras estas intervenciones se pueden dar casos de hipocalcemia transitoria debida a lesiones reversibles de las paratiroides, que son aún más frecuentes que el hipoparatiroidismo postquirúrgico permanente. De manera poco frecuente, las enfermedades infiltrativas como la hemocromatosis, la amiloidosis o las neoplasias metastásicas pueden afectar a las paratiroides y producir hipoparatiroidismo. El hipoparatiroidismo idiopático puede ser esporádico o tener carácter familiar y suele debutar en la infancia o en la adolescencia. Se asocia a menudo con otros trastornos como insuficiencia suprarrenal, diabetes, anemia perniciosa, moniliasis e hipotiroidismo. En este grupo de enfermedades se ha supuesto una patogenia autoinmune debida a la frecuente existencia de anticuerpos dirigidos contra la paratiroides, las suprarrenales, el tiroides y la mucosa gástrica. En todos los casos de hipoparatiroidismo los niveles de PTH son bajos o indetectables.

En cambio, el pseudohipoparatiroidismo se caracteriza por hipocalcemia e hiperfosfatemia a pesar de los niveles altos de PTH. El origen de este trastorno está en una resistencia ósea y renal a la acción de la PTH, el AMPc urinario no aumenta tras la perfusión intravenosa de un extracto de PTH. La falta de estimulación por la PTH y la hiperfosfatemia coexistente disminuyen la producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la disminución de esta forma activa de vitamina D puede colaborar a la hipocalcemia disminuyendo la absorción intestinal de calcio y facilitando la resistencia ósea a la PTH. Existen variantes en las que la resistencia a la PTH es sólo a nivel renal pero no óseo. En estos pacientes la calcemia puede ser normal. El pseudohipoparatiroidismo es un síndrome

frecuentemente familiar que se acompaña de varias anomalías del desarrollo: estatura baja, facies redondeada, obesidad y un acortamiento característico de los metacarpianos y metatarsianos III y IV. A veces existe retraso mental. Finalmente hay una minoría de pacientes a los que se agrupa como afectos de hipoparatiroidismo pseudoiidopático, que presentan características bioquímicas de pseudohipoparatiroidismo (hipocalcemia, hiperfosfatemia y PTH alta) en ausencia de alteraciones esqueléticas. Tras la perfusión de PTH exógena, el AMPc urinario de estos enfermos aumenta normalmente, por lo que se supone que espontáneamente segregan una forma defectuosa de PTH.

La hipomagnesemia es una de las causas más frecuentes de hipocalcemia en la actualidad. El mecanismo por el que la hipomagnesemia conduce a la hipocalcemia es doble: por un lado suprime la secreción de PTH por las paratiroides, por lo que los niveles de PTH serán habitualmente bajos o inapropiadamente normales para el grado de hipocalcemia, y por otra parte la hipomagnesemia produce resistencia del hueso a la PTH. En la hipomagnesemia característicamente el magnesio es inferior a 1 mg/dl y la hipocalcemia sólo se corrige al aportar magnesio, siendo resistente a la perfusión de PTH y a la administración de calcio y vitamina D. Frecuentemente se asocia hipopotasemia por trastorno en el mecanismo renal de conservación de potasio.

El déficit de vitamina D puede causar hipocalcemia y se da en varias circunstancias. Hoy en día y en nuestro medio es poco frecuente observar hipovitaminosis D por defecto de nutrición. Mucho más comunmente, el déficit de vitamina D es consecuencia de trastornos gastrointestinales malabsortivos: gastrectomía parcial, pancreatitis crónica, enfermedad de Crohn, resección intestinal y otros. Las enfermedades hepáticas disminuyen la formación de $25(\text{OH})\text{D}_3$, y varias sustancias como el alcohol, el fenobarbital y la difenilhidantoína aceleran la conversión de $25(\text{OH})\text{D}_3$ en metabolitos inactivos y pueden producir hipocalcemia por este mecanismo. En el síndrome nefrótico con filtrado glomerular normal el calcio sérico total baja principalmente como consecuencia de la hipoalbuminemia, pero estudios recientes indican que también disminuye el calcio iónico, ya que con la proteinuria se pierde la globulina transportadora de vitamina D y se reducen los niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Por otra parte, el raquitismo vitamino-D-dependiente es un trastorno familiar que se caracteriza por hipocalcemia, hipofosfatemia e hiperparatiroidismo secundario. Es debido a la deficiencia de la hidroxilasa que en el riñón convierte el $25(\text{OH})\text{D}_3$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y responde bien a la administración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

La hipocalcemia de la insuficiencia renal es debida a varias causas. La hiperfosfatemia disminuye los niveles de calcio sérico y así mismo dificulta la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por el ya de por sí insuficiente parénquima renal. El descenso de

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuye la absorción intestinal de calcio y también limita la respuesta del hueso a la acción calcémica de la PTH.

La hiperfosfatemia de cualquier causa, ya sea debida a aporte exógeno en enemas, lisis de células tumorales, rhabdomiolisis, etc., disminuye directamente los niveles de calcio sérico.

Excepcionalmente, las metástasis osteoblásticas pueden acompañarse de hipocalcemia debida a la aposición de calcio en el hueso (síndrome del hueso hambriento). Este mismo síndrome puede aparecer tras la corrección del hiperparatiroidismo primario mediante extirpación del adenoma de paratiroides, o bien tras el trasplante renal funcionante que tiende a suprimir el hiperparatiroidismo secundario propio de la insuficiencia renal crónica.

El mecanismo de la hipocalcemia que se presenta durante la fase aguda de la pancreatitis no se ha esclarecido totalmente. Parece ser que en primer lugar se produce un fenómeno de saponificación del calcio en la cavidad abdominal, y que la respuesta de la paratiroides a la hipocalcemia resultante es inadecuada produciéndose un estado de hipoparatiroidismo relativo.

La tabla nº II (pag 44), resume las principales causas de hipocalcemia.

TABLA II
CAUSAS DE HIPOCALCEMIA

Hipoalbuminemia
 Hipoparatiroidismo
 Seudohipoparatiroidismo
 Hipoparatiroidismo pseudodiopático
 Hipomagnesemia
 Déficit de vitamina D
 Nutricional
 Malabsorción
 Hepatopatías
 Fármacos que facilitan la degradación de vitamina D
 Fenobarbital
 Alcohol
 Difenilhidantoína
 Síndrome nefrótico
 Raquitismo vitamino-D-dependiente
 Insuficiencia renal
 Hiperfosfatemia
 Síndrome del hueso hambriento
 Pancreatitis

Tomada de Montoliú, 1988.

1.4.2. CLINICA DE LAS HIPOCALCEMIAS

La tetania producida por un aumento de la irritabilidad neuromuscular es el signo clínico fundamental de la hipocalcemia. Empieza con parestesias circulares y acras, para seguir con espasmos musculares que terminan en el característico espasmo carpopedal. La tetania latente puede ponerse de manifiesto estimulando ligeramente la zona del nervio facial para producir una contracción de los músculos faciales (signo de Chvostek) o inflando un manguito de presión por encima de la tensión arterial sistólica durante 3 minutos para producir el espasmo carpal (signo de Trousseau). La hipocalcemia

severa puede llegar a ocasionar verdaderas convulsiones y edema de papila. Los niños con hipocalcemia crónica de inicio temprano, particularmente si es debida a pseudohipoparatiroidismo, pueden presentar retraso mental. En el adulto la hipocalcemia importante ocasiona a veces demencia o psicosis. Se pueden dar toda una variedad de trastornos extrapiramidales, desde la coreoatetosis al hemibalismo. En ocasiones, pero no siempre, los trastornos extrapiramidales pueden asociarse a calcificaciones de los ganglios basales. En el hipoparatiroidismo existen frecuentemente alteraciones ectodérmicas: dermatitis, eczema, psoriasis, alopecia, presencia de surcos transversales en uñas, etc..

A nivel cardiovascular, la hipocalcemia alarga el intervalo Q-T del ECG, disminuye la sensibilidad a la digital, disminuye la contractilidad miocárdica y puede contribuir al desarrollo de insuficiencia cardíaca y arritmias ventriculares.

La hipocalcemia crónica puede acompañarse de cataratas. Si la hipocalcemia ya existe durante las primeras fases del desarrollo, aparecen anomalías dentarias de varios tipos.

1.5. TOXICIDAD DEL CALCIO.

1.5.1. HIPERCALCEMIAS.

Los datos expuestos en este apartado han sido tomados de Rapado y Castrillo, (1979). Peacock, (1981). Castrillo y Diaz Curiel, (1987). Montoliú, (1988).

La hipercalcemia es una alteración electrolítica bastante común, con una incidencia del 0,1 al 0,5 % de los pacientes hospitalizados, que se diagnostica cada vez con más frecuencia debido al uso rutinario de autoanalizadores de canales múltiples. Aunque su definición varía, según la metodología empleada, se puede considerar hipercalcemia todo valor de calcio sérico superior a 11 mg/dl.

1.5.1.1. CAUSAS DE HIPERCALCEMIA

Las alteraciones fisiopatológicas que pueden producir hipercalcemia son múltiples. Entre ellas están aumento de la resorción ósea, aumento en la absorción intestinal, y descenso en la eliminación renal, o una mezcla de los mismos; cuantitativamente la resorción de hueso es la más importante, al ser el esqueleto el depósito corporal principal

de calcio. Un 70-80 % de los casos de hipercalcemia están asociados a neoplasias o son debidos a hiperparatiroidismo.

El hiperparatiroidismo primario es debido en el 80-85 % de los casos a un adenoma único de las paratiroides, en el 15 % a hiperplasia difusa; y en el 1-3 % de los pacientes a carcinoma de paratiroides. El hiperparatiroidismo debido a hiperplasia es especialmente frecuente cuando forma parte de los síndromes familiares que se agrupan colectivamente bajo la denominación de neoplasia o adenomatosis endocrina múltiple, y de la cual existen dos tipos principales: el tipo 1, o síndrome de Wermer, en el que coexisten tumores hipofisarios, hiperparatiroidismo y síndrome de Zollinger-Ellison, y el tipo 2, donde se asocian hiperparatiroidismo, feocromocitoma y carcinoma medular del tiroides. Existen casos familiares de hiperparatiroidismo primario no necesariamente asociados a adenomatosis endocrina múltiple.

Otros trastornos endocrinos también pueden producir hipercalcemia. El hipertiroidismo lo hace a través de un aumento en la resorción ósea causado por las hormonas tiroideas. El feocromocitoma no asociado a adenomatosis endocrina múltiple, produce hipercalcemia por varios mecanismos: efecto directo de las catecolaminas sobre el hueso, estimulación adrenérgica de la secreción de PTH o producción de un factor humoral capaz de inducir resorción ósea. La insuficiencia suprarrenal, especialmente durante las crisis agudas, puede ir acompañada de hipercalcemia. El mecanismo se desconoce, pero un factor importante podría ser la hemoconcentración con aumento de las proteínas plasmáticas y del calcio fijado a ellas.

La hipercalcemia hipocalciúrica familiar se caracteriza por herencia autosómica dominante, hipercalcemia asintomática, hipocalciuria y niveles de PTH y glándulas paratiroides normales.

La hipercalcemia asociada a neoplasias puede producirse por varios mecanismos diferentes, que difieren según el tipo de neoplasia implicada y si existen o no metástasis óseas. Se pueden distinguir tres grupos principales. El primer grupo lo constituyen los cánceres hematológicos. El ejemplo característico es el mieloma, pero también hay que incluir a diversos tipos de linfoma, de los cuales el más constantemente asociado a hipercalcemia es la leucemia-linfoma de células T del adulto inducido por retrovirus. Los cánceres hematológicos producen hipercalcemia por factores locales o sistémicos. Entre los factores locales el más importante es la elaboración del factor activador de los osteoclastos, que favorece la resorción ósea en las zonas contiguas a las células neoplásicas. Entre los factores sistémicos, que actúan a distancia, están la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por parte de algunos linfomas y también se pueden elaborar otras sustancias

de naturaleza mal conocida que una vez segregadas por las células tumorales son capaces de inducir hiperreabsorción ósea por vía humoral, sin que las células neoplásicas estén en contacto con el hueso.

El segundo grupo de neoplasias asociadas a hipercalcemia lo constituyen los tumores sólidos con metástasis óseas. Las neoplasias implicadas con mayor frecuencia son las de pulmón de células escamosas, las de mama, y las de páncreas. El mecanismo implicado es la erosión directa del hueso por las células tumorales, aunque también pueden intervenir factores como la producción local de prostaglandinas por parte de las células metastásicas.

El tercer grupo de neoplasias con hipercalcemia son los tumores sólidos sin metástasis óseas. Los ejemplos más característicos son los carcinomas de pulmón, riñón, páncreas u ovario. La hipercalcemia se desarrolla a través de la producción por parte de la neoplasia de una sustancia que por vía humoral estimula la resorción osteoclástica del hueso. La naturaleza de dicha sustancia, o sustancias, no se ha definido con claridad. Sin embargo, se puede señalar que en contra de lo que muchas veces se cree, esta hipercalcemia nunca, o casi nunca, se debe a la producción ectópica de PTH o sustancias similares. Algunas veces se ha implicado a la producción de prostaglandinas por la neoplasia, que actuando por vía general favorecerían la resorción ósea.

En el síndrome de inmunodeficiencia adquirida complicado con infección por citomegalovirus puede desarrollarse una hipercalcemia quizá debida a que la propia infección por citomegalovirus o el virus causante del síndrome induzcan un aumento de la actividad osteoclástica.

Varias enfermedades granulomatosas pueden asociarse a hipercalcemia, y aún con mayor frecuencia a hipercalcemia. La sarcoidosis es el principal ejemplo, pero estas alteraciones se han descrito también en la tuberculosis, beriliosis, coccidioidomicosis e incluso en granulomas inducidos por sílica. La hipercalcemia viene mediada por la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los macrófagos del granuloma.

La intoxicación por vitamina D y por vitamina A son otras causas de hipercalcemia. En el caso de la vitamina A la hipercalcemia quizá sea debida a un aumento en la secreción de PTH inducido directamente por la propia vitamina. La intoxicación por vitamina D ya se comentó en el apartado 1.2.2.

La inmovilización prolongada en individuos con un aumento del recambio óseo puede producir hipercalcemias importantes. Esta situación se da especialmente en niños y en la enfermedad de Paget.

El síndrome de la leche y los alcalinos se da en pacientes con úlcera péptica que

ingieren grandes cantidades de leche y antiácidos absorbibles. Estos pacientes desarrollan entonces hipercalcemia, alcalosis metabólica, calcificaciones metastásicas, nefrocalcinosis e insuficiencia renal.

La administración de diuréticos tiazídicos puede asociarse al desarrollo de hipercalcemia. En individuos normales sólo se produce una elevación transitoria y ligera del calcio sérico, debida a hemoconcentración de las proteínas plasmáticas y a la disminución urinaria de calcio que se observa con estos fármacos. Sin embargo, en pacientes con aumento de resorción ósea secundario a hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget, inmovilización, o administración de vitamina D, las tiazidas pueden potenciar el proceso de disolución ósea y favorecer la aparición de hipercalcemia franca.

El litio también se ha implicado en la hipercalcemia de algunos pacientes que lo recibían para el tratamiento de trastornos maniaco-depresivos. El mecanismo se desconoce, pero es posible que intervenga un aumento de PTH.

En la fase diurética de la insuficiencia renal aguda, especialmente la debida a rhabdomiólisis, se puede observar hipercalcemia con una cierta frecuencia. Hasta ahora se suponía que durante la fase oligúrica se depositaban calcio y fosfato en los músculos lesionados y que la hipercalcemia de la fase diurética se debía a la disolución de estos complejos de calcio y fosfatos. Datos más actuales indican que la hipocalcemia de la fase oligúrica puede ser secundaria a la disminución de síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, en la que a su vez puede influir decisivamente la hiperfosfatemia propia de la insuficiencia renal. Durante la fase poliúrica, la hipercalcemia se asocia a niveles altos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y PTH, y por lo tanto podría ser debida a un estado de hiperparatiroidismo secundario persistente al recuperar el filtrado glomerular, siendo los niveles altos de PTH los responsables de un aumento en la síntesis renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

En pacientes con trasplantes renales funcionantes se puede detectar hipercalcemia hasta en el 35 % de los casos. Probablemente se deba a la persistencia del hiperparatiroidismo propio de la insuficiencia renal, ya que aunque se recupere la función renal, si las glándulas paratiroides se hallaban previamente hiperplasiadas, tardan varios meses o incluso años en involucionar.

El término "hiperparatiroidismo terciario" se aplica a aquellos pacientes con insuficiencia renal crónica e hiperparatiroidismo secundario que con el paso del tiempo llegan a desarrollar hipercalcemia espontánea. Esta situación se debe a un gran aumento de la masa total de las glándulas paratiroides, y no representa autonomía de las mismas puesto que cada célula individual responde normalmente a las variaciones del calcio sérico.

La tabla n° III (pag 49), resume las principales causas de hipercalcemia.

TABLA III
CAUSAS DE HIPERCALCEMIA

Endocrinas

- Hiperparatiroidismo primario
- Hipertiroidismo
- Feocromocitoma
- Insuficiencia suprarrenal

Hipercalcemia hipocalciúrica familiar

Neoplasias

- Cánceres hematológicos
- Tumores sólidos con metástasis óseas
- Tumores solidos sin metástasis óseas

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

Enfermedades granulomatosas

Intoxicación por vitamina D y por vitamina A

Inmovilización

Síndrome de la leche y alcalinos

Tiacidas

Litio

Fase diurética de la insuficiencia renal aguda

Trasplante renal

Hiperparatiroidismo terciario

Tomada de Montoliú. 1988.

1.5.1.2. CLINICA DE LAS HIPERCALCEMIAS

La sintomatología de la hipercalcemia es muy variable, dependiendo del nivel de calcio sérico y de la enfermedad fundamental que la acompaña. En un extremo del espectro clínico se encuentra el paciente asintomático con hipercalcemia descubierta en unos análisis de rutina, y en el otro extremo hallamos al paciente comatoso a consecuencia de una crisis hipercalcémica.

La crisis hipercalcémica constituye una emergencia médica que se caracteriza por hipercalcemia severa (superior a 15 mg/dl), insuficiencia renal, y obnubilación progresiva. Si no se trata, puede complicarse con la aparición de insuficiencia renal aguda oligúrica, coma, y arritmias ventriculares. La crisis hipercalcémica se da con mayor frecuencia en las neoplasias, pero también puede ocurrir en el curso del hiperparatiroidismo primario.

En los momentos de crisis hipercalcémicas ocurridas en el hiperparatiroidismo pueden darse síntomas o signos relacionados con afección del sistema nervioso central, tales como labilidad emocional o cambios de la personalidad, disminución de memoria, depresión, y aún transtornos psiquiátricos graves, obnubilación y coma. En esta condición, el calcio entra en el espacio extracelular más rápidamente de lo que puede ser excretado, y los efectos de la misma hipercalcemia, la hipovolemia, la hiperfosfatemia, la afección tubular renal y disminución del filtrado glomerular, incrementan el fallo de excreción y agravan a su vez la hipercalcemia. Antes de la aparición de las manifestaciones del sistema nervioso central aparecen cansancio, náuseas, vómitos, sed, poliuria, dolor abdominal, somnolencia, y puede llegarse hasta la pérdida de conciencia. Dentro de las manifestaciones neurológicas, la fatiga fácil es una de las más frecuentes, a ella se añade la debilidad muscular proximal, auténtica miopatía proximal cuya etiología no está aclarada. La biopsia muscular demuestra atrofia del músculo con afección predominante de las fibras tipo II; la atrofia de estas fibras es característica de las lesiones neuropáticas. El electrograma muestra un modelo de potencial polifásico compatible con denervación.

En individuos hipercalcémicos, y particularmente en el hiperparatiroidismo primario, existe un aumento de incidencia de úlcera péptica y de pancreatitis. El úlcus duodenal se ha sugerido que estaría asociado con la estimulación de la producción de gastrina por la hipercalcemia. Se han descrito cuadros de pancreatitis aguda, subaguda, y crónica en asociación con hiperparatiroidismo, y pueden encontrarse calcificaciones pancreáticas visibles radiológicamente. El estreñimiento pertinaz es un síntoma muy molesto en algunos pacientes hipercalcémicos, y aunque es raro, puede llegar a producir impactación fecal y obstrucción intestinal.

A nivel de aparato cardiovascular la hipercalcemia, especialmente si es severa y aguda, puede asociarse a hipertensión con renina plasmática alta y taquicardia. El acortamiento del intervalo Q-T es el signo electrocardiográfico más característico de la hipercalcemia. La hipercalcemia potencia el efecto de la digital sobre el corazón y favorece el trabajo del corazón sometido a sobrecarga, comportándose como colinérgico vasodilatador frente a los vasos coronarios (arterias). En hipercalcemias elevadas aparece bradicardia vagal, y la onda T se aplana o invierte. Con cifras muy elevadas de calcemia

hay fibrilación ventricular y muerte.

En el riñón la hipercalcemia antagoniza el efecto de la hormona antidiurética sobre el túbulo distal y colector, e induce un cierto grado de diabetes insípida nefrogénica, con hiposmolaridad urinaria, poliuria, polidipsia, y nicturia. La hipercalcemia puede producir una disminución aguda y reversible del filtrado glomerular posiblemente debida a vasoconstricción arteriolar. La excreción renal de varios iones, como el sodio, magnesio y potasio se ve facilitada por la hipercalcemia, y no es infrecuente que junto a este trastorno exista habitualmente hipopotasemia o hipomagnesemia. Los individuos con hipercalcemia no mediada por la PTH parecen predispuestos a desarrollar un discreto grado de alcalosis metabólica, quizá porque se disuelven en la circulación las sustancias tampón del hueso y además porque el calcio favorece la reabsorción de bicarbonato por el túbulo renal.

Los estados hipercalcémicos crónicos pueden producir calcificaciones metastásicas en el intersticio renal, conductos pancreáticos, mucosa gástrica, pulmones, piel, corazón, vasos sanguíneos, cartilago articular, y en la córnea y conjuntiva (queratopatía en banda). La aparición de estas calcificaciones ectópicas se asocia en general a fallo renal y retención de fosfatos. Las formas crónicas de hipercalcemia pueden conducir a nefrolitiasis, nefrocalcinosis, nefropatía intersticial y finalmente a la insuficiencia renal crónica.

Podemos también considerar en este apartado los efectos del calcio intravenoso. El calcio por vía endovenosa puede realmente ser muy peligroso. Un signo temprano de sus efectos adversos, puede ser una sensación de punzada en la boca junto a una sensación de calor que se extiende por todo el cuerpo. Tiene serios efectos sobre el corazón que remedan los efectos de la digital; y puede dar lugar a una fatal parada cardíaca en animales digitalizados, por lo que parece aconsejable evitar el calcio i.v. en pacientes que también reciban digital (excepto en caso de hipocalcemia severa sintomática). La reducción del calcio ionizado por un agente quelante ha dado buenos resultados en el tratamiento de las arritmias digitálicas.

1.5.2. CALCIFILAXIA Y CALCERGIA.

Se define el concepto de calcifilaxia como calcificación selectiva en distintos órganos y tejidos por un agente desencadenante previa administración de otro preparante o sensibilizante. Sin embargo el término calcergia se ha descrito como un tipo especial de hipersensibilidad, sin necesidad de agente sensibilizante previo, que estaría producida por

agentes calcificantes directos denominados calcígenos (algunas sales de plomo, de indium, de zinc, etc.).

1.5.3. MANIFESTACIONES LOCALES.

Ciertas sales de calcio, especialmente el cloruro, son intensamente irritantes para los tejidos y pueden causar un esfacelo doloroso si se inyectan subcutáneamente. Por eso cuando se administra cloruro de calcio por vía parenteral se recomienda hacerlo en forma i.v. esforzándose por evitar su extravasación.

2. ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Es indudable la importancia de la actividad adrenérgica en el control del tono arterial, y desde hace tiempo se sabe que tanto el estímulo de los receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos, como el estímulo de los receptores α_2 adrenérgicos postsinápticos, produce un aumento del tono vascular (Langer 1981; Starke 1981; Timmermans y Van Zwieten 1981, 1982). Ya hemos señalado en el apartado 1.3. de la Introducción que para que se produzca este aumento de tono es imprescindible que tenga lugar un incremento en el nivel intracelular de calcio iónico, de forma que las variaciones del nivel de calcio libre dentro de la célula del músculo liso vascular van a condicionar y regular su actividad contráctil. Las alteraciones en la tensión arterial podrán estar por tanto relacionadas con alteraciones en la homeostasis celular del calcio. Aunque no podemos olvidar la importancia que tiene la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, lógicamente el aporte de calcio desde el medio extracelular podrá también condicionar en buena medida las respuestas contráctiles del músculo liso arterial.

Distintos grupos investigadores han intentado ya evaluar el papel que juega el calcio extracelular en la vasoconstricción adrenérgica (Van Meel et al. 1981 a, b; Van Meel et al. 1982; Van Zwieten et al. 1982, 1984, 1985; Reid et al. 1983; Hamilton et al. 1983; Timmermans et al. 1983, 1984; Van Zwieten y Timmermans 1984; Wilffert et al. 1984 a, b; Ruffolo y Yaden 1984; Ruffolo et al. 1984; Nichols y Ruffolo 1986; Van Zwieten 1986; Timmermans y Thoolen 1987; Timmermans et al. 1987 a, b). La utilización del calcio extracelular parece distinta cuando se estimulan receptores α_2 vasculares, o cuando se estimulan receptores α_1 vasculares. Con la utilización de antagonistas del calcio se pudo comprobar que la entrada del calcio extracelular por canales VOC es más importante para el efecto vasoconstrictor mediado por estímulo de receptores α_2 vasculares, que para el efecto vasoconstrictor mediado por estímulo de receptores α_1 vasculares. Más concretamente nuestro grupo de trabajo ha podido comprobar que en la preparación de "pithed rat" (rata descerebrada y desmedulada) la vasoconstricción producida por fármacos α_2 selectivos, como B-HT 920 y B-HT 933, puede prevenirse fácilmente mediante tratamiento con el antagonista del calcio nifedipina, y aumenta después de pretratamiento con el agonista del calcio BAY K 8644. La vasoconstricción producida por agonistas α_1 selectivos como metoxamina o fenilefrina, resulta mucho más resistente a estos tratamientos (Alexandre et al. 1990; Puero et al. 1990).

En esta Tesis Doctoral nos hemos planteado como Hipótesis que una disminución importante del calcio extracelular, es decir una hipocalcemia, podría conllevar una disminución de la entrada de calcio a la célula, y una disminución del efecto α presor. Con los antecedentes señalados es previsible que en situaciones de hipocalcemia tenga lugar

sobre todo una importante disminución de los efectos α_2 presores.

En la hipercalcemia los resultados son más difíciles de preveer, pues como ya hemos señalado en la Introducción (pag 21), el nivel fisiológico de calcio extracelular es siempre mucho mayor que el nivel de calcio intracelular. Por ello un incremento del calcio plasmático no necesariamente debe implicar un aumento de calcio intracelular, y cabe pensar que en la hipercalcemia el efecto α presor puede no modificarse mientras no se promueva activamente la entrada de calcio al interior de las células del músculo liso arterial. Dicho de otra manera, los efectos vasocostrictores α podrían permanecer constantes a partir de un nivel mínimo de calcemia capaz de aportar el calcio necesario para una contracción vascular adecuada. Hay además que tener en cuenta que tanto la administración aguda, como la ingesta continuada de calcio, paradójicamente se han asociado a descensos de presión arterial. Sobre este hecho haremos ahora algunos comentarios, y expondremos las principales aportaciones de otros autores hasta este momento.

Se sabe en realidad desde hace mucho tiempo que la ingesta continuada de calcio está correlacionada en forma inversa con la prevalencia de hipertensión, y con el nivel de presión arterial de la población. Las antiguas civilizaciones de egipcios, griegos, y romanos, ya reconocían las propiedades terapéuticas de las aguas naturales con elevado contenido mineral; más tarde Kobayashi fué el primero en sugerir una relación entre la ingesta de agua y la mortalidad asociada a enfermedad cerebrovascular (Kobayashi 1957). En 1973 Stitt y colaboradores constataron también la existencia de mayores niveles de presión arterial en los habitantes de ciudades donde se bebía agua con poco contenido en sales, siendo por el contrario menores los valores de presión arterial en los que vivían en ciudades con aguas duras, (Stitt et al. 1973). Ha podido apreciarse más recientemente la relación entre ingesta pobre en calcio y el desarrollo de hipertensión durante el embarazo (Belizan y Villar 1980, Belizan et al. 1981). Los suplementos de calcio modifican poco las presiones sistólicas medias y diastólicas medias en individuos normotensos, pero el efecto antihipertensivo del calcio puede apreciarse en pacientes hipertensos, y resulta significativo en ellos después de períodos prolongados de aporte (Belizan et al. 1983a, McCarron y Morris 1985, Johnson et al. 1985). Los estudios de Belizan et al. en mujeres gestantes demuestran que es un efecto dosis-dependiente y requiere dosis altas. En dichos estudios se conseguían únicamente descensos consistentes y significativos de presión arterial con suplementos de 2g de calcio elemento al día. (Belizan et al. 1983b).

La importancia de la ingesta de calcio en el desarrollo de hipertensión ha podido también apreciarse en algunos modelos animales. Pudo demostrarse que la presión

sanguínea aumentaba en ratas jóvenes y en ratas gestantes alimentadas con dieta deficiente en calcio (Itokawa et al. 1974; Belizan et al. 1981). Las ratas SHR (ratas espontáneamente hipertensas o genéticamente hipertensas), responden a los suplementos de calcio con descenso de la presión arterial (McCarron et al. 1981; Lau et al. 1984; Stern et al. 1987), y la cantidad de calcio en la dieta también condiciona el nivel de presión arterial en ratas Wistar Kyoto (WKY) que se utilizan usualmente como control genético normotenso de las ratas SHR (McCarron 1982).

Estudios recientes de Sutoo et al. con administración intracerebroventricular (i.c.v.) de Cl_2Ca en ratas y ratones, señalan que la administración aguda de calcio conduce a una disminución de la presión arterial que estaría producida por la entrada de calcio en sistema nervioso central (Sutoo et al. 1987, 1988, 1989).

En el momento actual no podemos sin embargo descartar que existan mecanismos periféricos implicados en el control que el nivel plasmático de calcio ejerce sobre la presión arterial. La disminución de la presión arterial resultante del incremento de la ingesta de calcio podría deberse a una reducción en las respuestas vasculares, es decir podría ser consecuencia de una hiporreactividad vascular. Stern et al. han estudiado las respuestas presoras de NA, y de angiotensina II en ratas SHR alimentadas con dieta enriquecida en calcio, valorando también en segmentos de la arteria de la cola de estas ratas la respuesta a NA, y al estímulo nervioso transmural (Stern et al. 1987). Dichos autores, en contra de lo esperado, encuentran mayores respuestas a NA y al estímulo transmural en estas preparaciones, respondiendo además las ratas con elevaciones presoras mayores cuando se les administraba NA o angiotensina II. En estas ratas no estaban alterados los niveles de aldosterona, ni la actividad de renina plasmática, y el aporte de calcio tampoco modificaba los niveles plasmáticos de NA o A. Para Stern et al. el efecto hipotensor del calcio parece por tanto asociarse paradójicamente con un aumento de la reactividad vascular.

Por otra parte las alteraciones del tono arterial asociadas a cambios en los niveles plasmáticos de calcio iónico han podido correlacionarse con alteraciones de la PTH en plasma. Los trabajos de Helstrom et al. resaltan por primera vez la implicación de las paratiroides en el control de la presión arterial. Estos trabajos señalaban que era frecuente la aparición de hipertensión en pacientes hiperparatiroides (Helstrom et al. 1958). El riesgo de desarrollo de hipertensión durante el embarazo también se ha correlacionado con el aumento progresivo de los niveles de PTH durante este período (Reitz et al. 1977). Varios autores corroboran más tarde que en pacientes hiperparatiroides aparece hipertensión con frecuencia mayor (Zawada et al. 1980; Lafferty 1981). La hipertensión

asociada con hiperparatiroidismo no era renina dependiente, ya que en pacientes con hiperparatiroidismo la tensión arterial elevada no respondía al tratamiento con saralasin (Zawada et al. 1980). Más recientemente Resnick et al. señalan que los pacientes que responden con descenso presor cuando se administra calcio son aquellos que muestran cifras plasmáticas de calcio iónico por debajo de las normales, y cifras de PTH en plasma por encima de lo normal (Resnick et al. 1986). En otros estudios también se han observado incrementos de PTH en pacientes hipertensos, existiendo usualmente una relación más estrecha entre actividad de las paratiroides y niveles de presión arterial en personas jóvenes (Grobbee et al. 1986, 1988; Hvarfner et al. 1987). De todos modos se desconoce si el aumento de PTH en la hipertensión es únicamente consecuencia de otras alteraciones que aparecen en su desarrollo, o si la hiperactividad de la glándula puede por sí misma contribuir a la elevación de la presión arterial. Cabe suponer que el aumento de actividad de las paratiroides en pacientes hipertensos sea consecuencia de la relativa necesidad de calcio que estos pacientes acusan. No puede sin embargo descartarse un papel más directo de la PTH en el control del tono arterial, ya que su administración continuada puede conducir a una elevación de las resistencias periféricas y de la presión sanguínea (Hulter et al. 1986). Además sabemos que el aumento en los niveles intracelulares de calcio es el factor final que determina el aumento de tono del músculo liso vascular, y la PTH puede aumentar los niveles de calcio intracelular en distintos tipos de células incluidas las células de músculo liso arterial (Borle 1968; Chausmer et al. 1972; Schleiffer et al. 1979; Bogin et al. 1981, 1982; Hulter et al. 1986). En 1987 Resnick postula que las hormonas que controlan el metabolismo del calcio y el sistema renina-angiotensina regularían de forma conjunta la retención de los minerales de la dieta y la disponibilidad celular de calcio. Los pacientes con alteraciones en la presión arterial que tuviesen niveles bajos en la actividad de renina plasmática, niveles bajos de calcio iónico en plasma, niveles bajos de calcitonina, y por el contrario niveles altos de Vit. D₃ y de PTH, podrían por consiguiente beneficiarse más de los suplementos de calcio (Resnick 1987).

También se ha podido demostrar la implicación de la PTH en el control de la presión arterial en ratas, habiéndose observado que la deficiencia crónica de PTH impide el aumento de presión sanguínea en estos animales (Schleiffer et al. 1981; Mann et al. 1984). Recientemente Togari et al. comprueban que se puede desarrollar hipertensión asociada a hiperparatiroidismo en ratas con 5 semanas de vida cuando se alimentan durante 2 semanas con dieta pobre en calcio. La hipertensión asociada a hiperparatiroidismo nutricional era resistente al tratamiento con captopril. Los cambios en la presión estuvieron precedidos por cambios en los niveles de calcio plasmático, y las

ratas en las que se extirpaban las paratiroides y recibían una dieta normal de calcio no mostraban aumento de presión arterial, pese a que los niveles de calcio plasmático descendían hasta valores similares a los que se registraban en las ratas con dieta pobre en calcio (Togari et al. 1989). Estos autores llegan por tanto a la conclusión de que los cambios en la concentración plasmática de calcio en ausencia de PTH no son capaces de modificar la presión sanguínea.

En el momento actual no ha podido aún esclarecerse por qué mecanismo se produce una elevación de la presión arterial cuando existe una ingesta pobre de calcio, y del mismo modo tampoco se sabe por qué la ingesta continuada de sales de calcio consigue controlar la hipertensión, (ver revisión de Grobbee y Wall-Manning, 1990).

Nuestra Hipótesis de trabajo en esta Tesis Doctoral es que los efectos hipotensores del calcio se deben al menos en parte a mecanismos periféricos que implican alteración de respuestas α vasculares. Es decir, que tanto la elevación aguda de la calcemia como el mantenimiento prolongado de niveles altos de calcio plasmático, pueden asociarse con modificación de los efectos presores mediados por estímulo de receptores α_1 y α_2 postsinápticos vasculares.

Para poder analizar la veracidad de nuestras hipótesis de trabajo nos hemos planteado como Objetivo en esta Tesis Doctoral estudiar en la preparación de "pithed-rat" el efecto presor del agonista α_1 selectivo metoxamina, y el efecto presor del agonista α_2 selectivo B-HT 920, cuando existe una modificación de los niveles de calcio plasmático. Se llevarán a cabo estudios en ratas normocalcémicas, hipocalcémicas e hipercalcémicas. Los estudios en ratas hipercalcémicas merecerán especial consideración, ya que la hipercalcemia además de poderse considerar patológica en sí misma, acompaña según hemos podido constatar en el apartado 1.5.1. de la Introducción, a múltiples situaciones que fácilmente pueden aparecer en clínica. En concreto, si las respuestas α vasculares se modifican en la hipercalcemia, todos aquellos tratamientos que puedan modificar la regulación adrenérgica del tono arterial deberán considerar la condición de hipercalcemia con especial cautela. El mantenimiento continuado de niveles altos de calcio en sangre puede conllevar alteraciones de la reactividad vascular distintas de las producidas cuando tiene lugar una elevación aguda de la calcemia. Por tanto se utilizarán para este estudio ratas hipocalcémicas, ratas a las que se les provoca una elevación aguda de la calcemia y ratas que mantengan una situación de hipercalcemia más o menos prolongada.

Para nuestro estudio será en primer lugar necesario conseguir los modelos animales adecuados que permitan los subsiguientes estudios en "pithed-rat". Conseguir estos modelos animales constituye en sí mismo un Objetivo prioritario dentro del contexto de la

Tesis Doctoral, ya que dichos modelos pueden ser de gran utilidad en un futuro para otros estudios sobre modificación de respuestas farmacológicas al variar la calcemia. Intentaremos conseguir ratas con distintos niveles de calcio en sangre, y además de inducir una elevación aguda de la calcemia, será preciso establecer un método de aporte de calcio a los animales que consiga mantener en ellos el nivel de calcio en sangre por encima de los valores normales durante períodos prolongados de tiempo.

Aunque sabemos que las cifras normales de calcio plasmático en el hombre varían muy poco y son próximas a 9.5 mg%, no hemos encontrado referencias concretas sobre la calcemia en ratas Sprague-Dawley macho, que son las que se utilizarán en este estudio. Comenzaremos por lo tanto por determinar la calcemia control de estos animales.

Para inducir hipocalcemia en las ratas se llevarán a cabo tratamientos con calcitonina, y para inducir hipercalcemia se llevarán a cabo tratamientos con distintas sales de calcio según las pautas que posteriormente describiremos en el apartado de Material y Métodos. Hemos estimado que para inducir hipercalcemia subcrónica deberán existir como mínimo niveles de calcio elevados en sangre durante 12 días, y para los estudios de hipercalcemia crónica los niveles de calcio deberán permanecer elevados al menos durante 2 meses. En los distintos grupos de ratas se estimará el nivel de calcio iónico libre en plasma, que como ya sabemos es el que puede acceder al interior celular para promover la contracción del músculo liso vascular, y se seleccionarán los tratamientos que puedan ser útiles para los estudios en "pithed-rat".

Hemos seleccionado esta preparación ya que en ella la rata se descerebra y desmedula antes de comenzar los registros presores, de forma que dichos registros traducen únicamente el efecto periférico de los fármacos.

Escapa de los objetivos de esta Tesis Doctoral analizar la posible implicación de la PTH en el control de la presión arterial. Sin embargo con los conocimientos actuales estimamos que en las ratas con hipercalcemia mantenida, puede ser importante tanto la determinación de la presión arterial, como la determinación de los niveles de PTH en plasma. Esto podrá con toda seguridad ayudar a interpretar mejor los resultados en este grupo de ratas.

Aunque serán necesarios con toda seguridad estudios adicionales para llegar a conocer los mecanismos implicados en el efecto hipotensor del calcio, el estudio que abordamos permitirá prever variaciones del efecto α presor cuando se modifican los niveles de calcio plasmático, y los resultados que se obtengan posiblemente ayuden a esclarecer el mecanismo por el cual el nivel plasmático de calcio puede controlar el tono arterial.

3. MATERIAL Y METODOS

Este estudio se llevará a cabo en ratas macho Sprague-Dawley. Se utilizarán ratas con distintos niveles de calcemia para estudiar en la preparación de "pithed-rat" el efecto presor del agonista α_1 metoxamina y del agonista α_2 B-HT 920. Comenzaremos por describir la metodología utilizada para las determinaciones analíticas y para inducir hipocalcemia e hipercalcemia en estos animales. Después describiremos la preparación de "pithed-rat" y los ensayos que se han llevado a cabo con ratas control y ratas de los grupos experimentales seleccionados después de los distintos tratamientos. En último lugar se expondrá el tratamiento estadístico de los datos.

3.1. DETERMINACIONES ANALITICAS

Para determinar la calcemia normal de las ratas macho Sprague-Dawley sacrificamos por decapitación, y previa anestesia con eter etílico, 20 ratas de 9 semanas de vida y peso 240-260 g que no habían sufrido ningún tratamiento.

La sangre de las ratas sacrificadas se recogió en tubos heparinizados, y se midió y anotó el volumen total de sangre recogida en cada una de las muestras. La sangre total se centrifugó a 8000 r.p.m. y 2° C de temperatura durante 15 minutos. A continuación se separó el plasma para determinar el calcio plasmático y las proteínas totales.

La valoración del calcio plasmático se llevó a cabo por el método colorimétrico de la O-Cresolftaleina-Complexona, que utiliza como reactivos: R1 = Tampón (2 metilpropanol 1,5 M) y R2 = Cromógeno (Ortocresolftaleina Complexona 0.18 mM).

La valoración de las proteínas totales se llevó a cabo por el método colorimétrico de Biurét, que utiliza como reactivos; R1 = Blanco (NaOH 0.40 M; K-Na-Tartrato 64 mM). R2 = Reactivo Biuret (NaOH 0.40 M; K-Na-Tartrato 64 mM; SO₄Cu 6.0 mM; KJ 61 mM). Se utilizó un autoanalizador Hitachi 717, calibrado previamente con el calibrador Multi de Boehringer Mannheim, utilizándose como controles de calidad Precinorm U y Precipath U de la misma casa.

A partir de los valores registrados de calcio plasmático y proteínas totales se calculó indirectamente el valor del calcio iónico mediante la fórmula de Zeisler (citado por Weissman y Pileggi 1980) que aparece en el apartado 1.1. de la Introducción (pag 7). Esta fórmula para la estimación del calcio iónico es la que actualmente utiliza el Servicio de Análisis y Laboratorio del Hospital del Aire de Madrid, centro donde se han llevado a cabo las determinaciones analíticas anteriormente referidas.

Para determinar la PTH normal de las ratas macho Sprague-Dawley sacrificamos por

decapitación, y previa anestesia con eter éterico, 10 ratas de 9 semanas de vida y peso 240-260 g que no habían sufrido ningún tratamiento.

La sangre de las ratas sacrificadas se recogió en tubos con etilendiaminotetraacetato (EDTA). La sangre total se centrifugó a 8000 r.p.m. y 2° C de temperatura durante 15 minutos. A continuación se separó el plasma para la determinación analítica de la hormona.

La valoración de la PTH se llevó a cabo por radioinmunoanálisis mediante un kit de valoración específico para el extremo N-terminal intacto para PTH de rata (INS-PTH, Nichols Institute Diagnostic, San Juan Capistrano, CA). Este ensayo requiere 4 días de incubación en presencia de suero anti PTH de pollo, 2 días con el anticuerpo y marcador de ¹²⁵I-PTH bovina (1-84), y 4 horas en presencia del segundo anticuerpo precipitante. Se utilizó PTH (1-34) humana para los standards. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario del Aire de Madrid.

En el momento de valorar las muestras se desconocía a que grupo experimental, y a que lote de ratas correspondía cada una.

Las determinaciones analíticas en las muestras procedentes de los distintos grupos experimentales de ratas se llevaron a cabo por el mismo procedimiento descrito para las muestras control.

3.2. INDUCCION DE HIPOCALCEMIA EN RATAS

La inducción de hipocalcemia aguda tuvo lugar en cuatro grupos experimentales de ratas macho Sprague-Dawley de 240-260 g y 9 semanas de vida, a las que se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) 1, 4, 8 y 16 U.I. respectivamente de CT de salmón. Para determinar el margen de tiempo en que existe hipocalcemia y el nivel de hipocalcemia alcanzado, se sacrificaron por decapitación, y previa anestesia con eter éterico, lotes de 10 ratas 1, 3, 5 y 7 horas después de las distintas administraciones.

3.3. INDUCCION DE HIPERCALCEMIA EN RATAS

3.3.1. INDUCCION DE HIPERCALCEMIA AGUDA

La inducción de hipercalcemia aguda tuvo lugar en 6 grupos experimentales de ratas macho Sprague-Dawley de 240-260 g y 9 semanas de vida. Para conseguir una elevación aguda de la calcemia en los grupos experimentales establecidos, se procedió a la administración i.p. de distintas cantidades de solución valorada de Cl_2Ca , inyectándose las siguientes cantidades de calcio elemento expresadas en mg/100 g: 1.1, 2.2, 4.4, 8.8, 13.2, y 17.6.

Para determinar el margen de tiempo en que existe hipercalcemia, y el nivel de hipercalcemia alcanzado en los grupos con administración igual o inferior de 8.8 mg Ca/100 g, se sacrificaron por decapitación, previa anestesia con éter etílico, lotes de 10 ratas 5, 15, 30, 60, 90, y 120 minutos después de las distintas administraciones. En el grupo experimental en el que se habían administrado 13.2 mg Ca/100 g se sacrificó un lote de 10 ratas 30 minutos después de la inyección, dejando otras 10 ratas tratadas en observación durante un período de 2 horas. Una vez transcurrido este período de tiempo también se sacrificaron aquellas que aún permanecían con vida. La administración de 17.6 mg Ca/100 g tuvo lugar en un lote de 10 ratas, sacrificándose 30 minutos después las que aún permanecían con vida. A las ratas de este último grupo experimental se les administró por vía i.p. una dosis de 150 U.I./kg de heparina justo antes de llevar a cabo la administración de Cl_2Ca .

3.3.2. HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

Para inducir hipercalcemia subcrónica se incrementó el contenido en sales de calcio en la dieta de los animales durante 14 días.

Para seleccionar el método óptimo para inducir hipercalcemia subcrónica se utilizaron 9 grupos experimentales de ratas macho Sprague-Dawley de 140-160 g y 7 semanas de vida. Las ratas Sprague-Dawley de nuestro estabulario usualmente ingieren agua natural con un contenido en calcio de 1 mg%, y dieta sólida Panlab A.04 (presentación en gránulos de 15 mm de diámetro), con un contenido en calcio de 7.1 g/kg, y con 1500 U.I./kg de Vit D₃. Esta dieta ha sido valorada según la normativa del "Good Laboratory Practices" (GLP) recomendada por la "Federal Drug Administration" (FDA). La

bebida y la comida de los animales permanece a libre disposición. El contenido en calcio del agua de Madrid se obtuvo mediante análisis efectuado por el Laboratorio de la Base Aérea de Getafe.

En cuatro de los grupos experimentales se aumentó el calcio en la dieta sólida, conservando igual las cantidades usuales del resto de los nutrientes, en otros cuatro grupos el incremento de calcio tuvo lugar en la bebida, y por último en el noveno grupo el incremento de calcio tuvo lugar tanto en la dieta sólida como en la dieta líquida. En estos nueve grupos experimentales la dieta sólida se proporcionaba en forma de harina fina. Esto permite una fácil homogeneización del contenido de los nutrientes cuando en ella se incrementa el contenido de calcio. La ingesta de los animales en todos los grupos experimentales, y en el curso de los distintos tratamientos, fué siempre voluntaria.

A continuación describimos las pautas de alimentación en los distintos grupos y en la Tabla IV (pag 66), aparece un resumen de las mismas.

Los grupos I, II, III y IV bebieron agua natural a libre disposición y en ellos se modificó la dieta sólida pudiendo alternativamente administrarse Vit D₃ a los animales el día de comienzo del tratamiento según se describe:

Grupo I: Añadiendo CO₃Ca a la dieta sólida Panlab A.04 hasta conseguir una concentración del 4 % de calcio elemento en la misma.

Grupo II: Añadiendo CO₃Ca a la dieta sólida Panlab A.04 igual que el grupo I, pero después de una inyección i.m. de 100000 U.I. de Vit D₃ a cada animal el día de comienzo del tratamiento.

Grupo III: Añadiendo CO₃Ca a la dieta sólida Panlab A.04 hasta conseguir una concentración del 8 % de calcio elemento en la misma.

Grupo IV: Añadiendo CO₃Ca a la dieta sólida Panlab A.04 igual que el grupo III, pero después de una inyección i.m. de 100000 U.I. de Vit D₃ a cada animal el día de comienzo del tratamiento.

En los grupos V, VI, VII y VIII, no se modificó la composición de la dieta sólida habitual, pero se incrementó el calcio de la bebida por el procedimiento que se describe:

Grupo V: Sustitución del agua de bebida por una solución de Cl₂Ca con una concentración de 2 % de calcio elemento.

Grupo VI: Sustitución del agua de bebida por una solución de Cl₂Ca con una concentración de 1.5 % de calcio elemento.

Grupo VII: Sustitución del agua de bebida por una solución de pidolato de calcio con una concentración de 2 % de calcio elemento.

Grupo VIII: Sustitución del agua de bebida por una solución de pidolato de calcio

con una concentración de 1.5 % de calcio elemento.

Por último se utilizó otro grupo experimental (grupo IX) en el que se modificó la composición de la dieta sólida y la composición de la dieta líquida de la forma siguiente:

Grupo IX: Aumentando el contenido de calcio en la dieta sólida igual que en el grupo I (4 % de calcio elemento) e incremento del contenido de calcio en el agua de bebida igual que en el grupo VI (1.5 % de calcio elemento).

De las distintas sales de calcio utilizadas, el pidolato de calcio es sin duda la menos conocida. El pidolato de calcio es pirrolidón carboxilato de calcio. Su fórmula es compleja ($C_{10}H_{12}O_6N_2Ca$), y aparece desarrollada en la figura nº 10. En esta Tesis Doctoral nos referiremos a este compuesto como pidolato de calcio. Se ha utilizado la especialidad farmacéutica comercializada por los laboratorios B.O.I., S.A. como Ibercal[®]. Dicho preparado es de amplia utilización terapéutica en la actualidad para aquellos procesos que requieren un aporte suplementario de calcio, debido a su buena solubilidad y satisfactoria absorción digestiva, presentando además propiedades organolépticas adecuadas para su administración oral (Robert et al. en prensa, a, b)

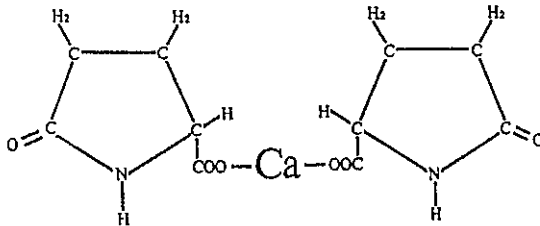


FIGURA 10.- Fórmula desarrollada del pidolato de calcio (Facilitada por el laboratorio B.O.I., S.A.).

TABLA IV

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONICA

<u>GRUPO</u>	<u>DIETA SOLIDA</u>	<u>DIETA LIQUIDA</u>
Control	Panlab A.04 (Ca 0.7%)	Agua natural (Ca 1%)
I	CO ₃ Ca (Ca 4%)	• • •
II	CO ₃ Ca (Ca 4%)+100000 UI Vit D ₃	• • •
III	CO ₃ Ca (Ca 8%)	• • •
IV	CO ₃ Ca (Ca 8%)+100000 UI Vit D ₃	• • •
V	Panlab A.04 (Ca 0.7%)	Cl ₂ Ca (Ca 2%)
VI	• • •	Cl ₂ Ca (Ca 1.5%)
VII	• • •	Pidolato cálcico (Ca 2%)
VIII	• • •	Pidolato cálcico (Ca 1.5%)
IX (II + VI)	CO ₃ Ca (Ca 4%)	Cl ₂ Ca (Ca 1.5%)

n=10

De cada grupo experimental se efectuaron dos lotes de 10 animales cada uno, que se sacrificaron por decapitación y previa anestesia con eter etílico, sucesivamente 2 y 14 días después de comenzar el tratamiento, para llevar a cabo las correspondientes determinaciones analíticas.

En los lotes de ratas que se sacrificaban a los 14 días se controló la cantidad ingerida al día de comida y bebida, pesándose los animales cada dos días durante todo el tratamiento. Como referencia se utilizó un grupo experimental control de 10 ratas macho Sprague-Dawley de 140-160 g y 7 semanas de vida. En éste grupo control las ratas se alimentaban con dieta Panlab A.04 en forma de harina fina y bebían agua natural a libre disposición.

Para inducir hipercalcemia crónica utilizamos un lote de 10 ratas del grupo experimental IX en las que prolongamos el tratamiento con sales de calcio establecido para este grupo durante dos meses. Transcurrido este periodo de tiempo las ratas se

sacrificaron por decapitación y previa anestesia con eter etílico, llevándose a cabo las correspondientes determinaciones analíticas.

Las ratas que siguieron un tratamiento crónico de 2 meses también se pesaron al finalizar dicho tratamiento, y su peso se comparó con el de las ratas del grupo control cuando estas alcanzaban una edad similar, es decir cuando tenían 15 semanas de vida.

Antes de sacrificar a los animales del grupo control se procedió a realizar una determinación de PAS y PAD mediante canulación de la arteria carótida derecha; igualmente se realizó este procedimiento en las ratas del grupo experimental IX a los 2 días, 14 días, y 2 meses de iniciado el tratamiento por vía oral con sales de calcio.

En estos mismos lotes de ratas además de las determinaciones de calcemia se efectuaron también determinaciones de PTH.

3.4. PREPARACION DE "PITHED - RAT"

La preparación de "pithed-rat" se montó basándonos en la técnica originalmente descrita por Shipley y Tilden (1947) y más recientemente por Gillespie (1967, 1970). A continuación se detalla el procedimiento seguido para montar la preparación.

Introducimos la rata en una campana de cristal, en la que previamente hemos puesto para su anestesia un algodón impregnado de eter etílico. Después de 5-7 minutos la rata queda anestesiada, y la situamos entonces en una cama para ensayos de animal "in vivo" en posición decúbito supino. Efectuamos una incisión en la zona ventromedial del cuello, y procedemos a separar y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal de aproximadamente 4 cm de largo y 2.5 cm en su zona más ancha. A través del ojal se separan los músculos paratraqueales hasta dejar al descubierto la tráquea. Pasamos dos hilos por debajo de ésta, y realizamos una incisión entre dos anillos traqueales introduciendo a su través una cánula que queda anudada con los hilos (uno en posición proximal y otro en posición distal). A continuación, y para evitar que el animal siga absorbiendo más anestésico, procedemos a descerebrarlo y desmedularlo con un vástago metálico de 18 cm de largo y 1.5 mm de diámetro. Para descerebrar al animal dicho vástago se introduce por la órbita del ojo derecho, pasando por el "foramen magnum", hasta alcanzar el bulbo raquídeo, y a continuación se hace avanzar por el canal medular hasta el sacro, completando así la desmedulación. Inmediatamente después conectamos la cánula traqueal a un aparato de respiración asistida (Scientific & Research Instruments Ltd. "ventilador para animales pequeños"). Administramos un volumen de aire de 2 cc por

cada 100 g de peso del animal, con una frecuencia de 50 emboladas por minuto. Después de instaurar la respiración asistida, disecamos el paquete vésculo-nervioso del lado derecho formado por la arteria carótida primitiva y el nervio vago, separamos y cortamos dicho nervio dejando libre la arteria, y pasamos por debajo de ésta dos hilos, ligando el correspondiente a la parte distal, y dejando iniciado un nudo en el correspondiente a la parte proximal para la posterior ligadura de una cánula. Una vez que tenemos preparada de esta manera la arteria carótida, colocamos una pinza de arteria entre ambos hilos, que queda cercana al nudo proximal que habíamos iniciado. La pinza tiene como misión interrumpir la circulación para permitirnos realizar con una fina tijera un pequeño corte arterial (de aproximadamente la mitad del calibre de la arteria). Por esta incisión introducimos una fina cánula acoplada a una jeringuilla que nos permite inyectar lentamente 150 U.I./kg de heparina sódica en un volumen de suero fisiológico de 0.2 cc con el fin de evitar la posterior coagulación sanguínea durante el ensayo. Soltamos momentáneamente la pinza mientras dura la administración de la heparina. Una vez terminada la administración de heparina, y ajustada de nuevo la pinza, se retira el sistema de inyección, y se introduce a través de la incisión una cánula de plástico, previamente conectada a un sistema cerrado lleno de suero fisiológico a un transductor de presión. La cánula debe fijarse firmemente por los hilos que teníamos preparados. En este momento se procede a retirar la pinza arterial y el sistema queda conectado permitiéndonos medir la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD). Contralateralmente disecamos y cortamos el nervio vago, y disecamos la yugular izquierda, ligándola con un hilo en su parte distal, y dejando iniciado un nudo con otro hilo en la parte proximal. Realizamos un corte con una fina tijera (de aproximadamente la mitad del calibre de la vena), para posteriormente introducir una cánula. Procedemos a dilatar la vena (que generalmente se encuentra colapsada debido a las manipulaciones), mediante tracciones con unas pinzas finas, o bien con un algodón impregnado en suero fisiológico caliente, y una vez que se dilata la vena introducimos la cánula dejándola firmemente anudada con los hilos que habíamos colocado. Esta cánula está conectada a un goteo de suero fisiológico cerrado. Esto nos permitirá administrar en bolo todos los fármacos por vía i.v.. Para las administraciones en bolo introducimos un volumen de 0.4 ml/kg en la vena. Es decir que las disoluciones se llevan a cabo para inyectar siempre la cantidad prevista de fármaco en un volumen de 0.1 ml. Cuando inyectamos en la cánula de la yugular izquierda un fármaco, procedemos a lavar el sistema con el goteo de suero fisiológico dejando pasar un volumen de 0.1 ml para el arrastre de cada dosis. Alternativamente en algunos ensayos se introducía un cateter por la yugular conectado a una jeringuilla que a su vez estaba

acoplada a una bomba Scientific & Research Instruments LTD para la infusión de fármacos. La temperatura de la rata durante todo el ensayo se mantiene constante a 37°C por medio de calor radiante.

Los cambios en la PAS y PAD se registraron a través del sistema de adquisición de señales analógicas DATASYSTEM 4C de Panlab S. L., que permite la digitalización, visualización, almacenamiento y posterior reproducción de señales analógicas, y que consta de los siguientes elementos:

- Unidad digitalizadora de 4 canales Pb40032
- Tarjeta Pb40031
- Ordenador Olivetti PCS 286
- Impresora matricial Seikosha SP-2000
- Programa DS4C de Panlab S. L.

Este sistema permite que las señales aparezcan sobre pantalla en tiempo real, y una vez almacenadas se puedan reproducir en pantalla o impresora. Asimismo, estas señales se pueden volcar de nuevo al registrador. La frecuencia de muestreo es de 50 muestras por segundo para cada uno de los canales utilizados.

3.5. ENSAYOS EN "PITHED - RAT"

Los ensayos de "pithed-rat" se llevaron a cabo utilizando ratas con distintos niveles de calcio en sangre y obteniendo las curvas dosis-respuesta de metoxamina y B-HT 920 en los grupos experimentales seleccionados para estos ensayos. En la tabla V, pag 70, se presentan los niveles de calcio iónico de los grupos experimentales de ratas con alteraciones de la calcemia seleccionados para ensayos con los agonistas α en "pithed-rat", y aparecen también los márgenes de dosis seleccionados para obtener las curvas dosis respuesta de cada agonista.

En cada rata se obtuvo una única curva dosis-respuesta con el agonista α que se estudiaba llevándose a cabo siempre 5-7 ensayos homogéneos. Los ensayos con agonistas α en ratas que presentaban alteraciones de la calcemia se compararon con ensayos similares en ratas control.

TABLA V
ENSAYOS EN "PITHED-RAT"

	<u>CALCIO IONICO mg%</u>	<u>AGONISTAS α</u>
HIPOCALCEMIA	{ 4.14 \pm 0.05	} Metoxamina 10-3000 μ g/kg B-HT 920 1-1000 μ g/kg
	{ 3.59 \pm 0.12	
HIPERCALCEMIA AGUDA	{ 7.56 \pm 0.19	
	{ 12.1 \pm 0.44	
HIPERCALCEMIA SUBCRONICA (Tto. 14 días)	{ 6.67 \pm 0.15	
	{ 5.34 \pm 0.07	
HIPERCALCEMIA CRONICA (Tto. 2 meses)	{ 5.34 \pm 0.07	

Las curvas dosis-respuesta de los agonistas α en ratas hipocalcémicas se obtuvieron comenzando la administración del fármaco en estudio 3 horas después de la administración i.p. de 1 U.I. de CT cuando se deseaban niveles de calcio iónico en plasma de 4.14 \pm 0.05 mg%, y 5 horas después de la administración i.p. de 4 U.I. de CT cuando se deseaban niveles de calcio iónico en plasma de 3.59 \pm 0.12 mg%.

Las curvas dosis-respuesta de los agonistas α en ratas con hipercalcemia aguda se obtuvieron comenzando la administración del fármaco en estudio 15 minutos después de la administración i.p. de 2.2 mg Ca/100 g de peso en forma de Cl_2Ca cuando se deseaban

niveles de calcio iónico en plasma de 7.56 ± 0.19 mg%, y 15 minutos después de la administración i.p. de 8.8 mg Ca/100 g de peso en forma de Cl_2Ca cuando se deseaban niveles de calcio iónico en plasma de 12.1 ± 0.44 mg%.

También se realizaron otros ensayos evaluando las respuestas a la administración de una dosis única de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de los agonistas α (metoxamina o B-HT 920) en condiciones basales y después de la administración de 8.8 mg Ca/100 g en forma de Cl_2Ca i.p. en la misma rata.

Para comprobar si existía un efecto hipotensor por la administración aguda de calcio llevamos a cabo 2 tipos de ensayos. En unos se llevó a cabo una administración i.p. de Cl_2Ca (8.8 mg Ca/100 g), evaluándose con intervalos de 10 minutos las variaciones de la PAS y de la PAD durante los 90 minutos siguientes a la administración. En otros, primero elevamos la presión arterial mediante una infusión por la yugular de 50 $\mu\text{g}/\text{min}$ de metoxamina, y una vez estabilizada esta hipertensión inducida (25 minutos después), administramos i.p. 8.8 mg Ca/100 g en forma de Cl_2Ca evaluándose el descenso presor producido al compararse estos ensayos con otros similares sin administración i.p. de Cl_2Ca .

Los ensayos en ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica se llevaron a cabo utilizando ratas que habían seguido tratamiento con sales de calcio correspondiente al grupo IX (ver tabla IV, pag 66) durante 14 días y 2 meses respectivamente.

En los ensayos con metoxamina se estudió la modificación de la PAS y de la PAD producidos por la administración sucesiva de dosis crecientes (10-3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de fármaco inyectadas en bolo por la yugular izquierda. Cuando se administraban dosis bajas de metoxamina se esperaba conseguir la recuperación de la PAS y PAD hasta los niveles basales antes de administrar la siguiente dosis. Después de las dosis más elevadas en ocasiones no se recuperaban los niveles de presión basales, por lo que se administraba la dosis siguiente después de transcurrido un tiempo razonable en el que se estabilizaba la presión arterial.

En los ensayos con B-HT se estudio la modificación de la PAS y de la PAD producidos por la administración sucesiva de dosis crecientes (1-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de fármaco inyectadas en bolo por la yugular izquierda. Las dosis de B-HT 920 se administraban en forma acumulativa, con un margen de tiempo razonable entre dos dosis ya que después de obtenerse las respuestas presoras con este fármaco no se conseguía en general volver a los niveles basales de presión arterial.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se agruparon los datos experimentales procedentes de ensayos homogéneos y se calculó la media (\bar{x}), la desviación típica (σ) y el error standard de la media (ESM), con el programa FIG. P de Biosoft.

Para obtener la significación estadística se utilizó la prueba de la "t de Student" para comparación de medias en poblaciones no emparejadas. El valor de "t" observado en la tabla de distribución de "Student" con los correspondientes grados de libertad en cada caso nos da la probabilidad de error con el 95 % de intervalo de confianza ($p < 0.05$), con el 99 % de intervalo de confianza ($p < 0.01$), y con el 99.9 % de intervalo de confianza ($p < 0.001$). Consideramos significativa la diferencia para valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. MODELOS DE HIPOCALCEMIA EN RATAS

La administración i.p. de CT (1-16 U.I.) en las ratas ocasionó un descenso de la calcemia y de los valores de calcio iónico en plasma. El descenso de la calcemia y el descenso del calcio iónico en plasma fué más acusado cuando se administraban dosis más altas de CT. Los valores más bajos de calcemia y calcio iónico aparecieron más tarde cuando se administraban dosis más altas. Ver Tabla VI (pag. 75), y figuras 11 y 12 (pags. 76 y 77).

No observamos diferencias entre la cantidad de sangre recogida en las ratas inyectadas con CT y las ratas del grupo control. Los valores de las proteínas totales fueron asimismo muy parecidos en el grupo control y las ratas tratadas con CT.

TABLA VI

CALCIO PLASMÁTICO Y CALCIO IÓNICO EN RATAS DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE HIPOCALCEMIA AGUDA CON DIFERENTES DOSIS DE CALCITONINA i.p.

CALCITONINA (U.I.)	CALCIO PLASMÁTICO (mg%)				CALCIO IÓNICO (mg%)			
	1 hora	3h	5h	7h	1h	3h	5h	7h
1	8.67±0.33 ^{***}	8.09±0.09 ^{***}	7.97±0.35 ^{***}	8.77±0.47 ^{***}	4.24±0.07 ^{***}	4.14±0.05 ^{***}	4.03±0.17 ^{***}	4.39±0.23 ^{***}
4	8.30±0.35 ^{***}	7.91±0.09 ^{***}	7.15±0.24 ^{***}	6.39±0.02 ^{***}	4.13±0.11 ^{***}	3.99±0.07 ^{***}	3.59±0.12 ^{***}	2.94±0.03 ^{***}
8	8.01±0.24 ^{***}	7.90±0.18 ^{***}	7.04±0.10 ^{***}	5.74±0.16 ^{***}	3.87±0.12 ^{***}	3.80±0.09 ^{***}	3.46±0.04 ^{***}	2.57±0.07 ^{***}
16	7.63±0.13 ^{***}	7.45±0.10 ^{***}	6.62±0.12 ^{***}	5.64±0.03 ^{***}	3.84±0.13 ^{***}	3.60±0.04 ^{***}	3.26±0.06 ^{***}	2.52±0.05 ^{***}

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-8 ratas

- Calcio plasmático grupo control: 10.38±0.06 mg%

- Calcio iónico grupo control: 4.99±0.04 mg%

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

INDUCCION HIPOCALCEMIA AGUDA CALCIO PLASMATICO

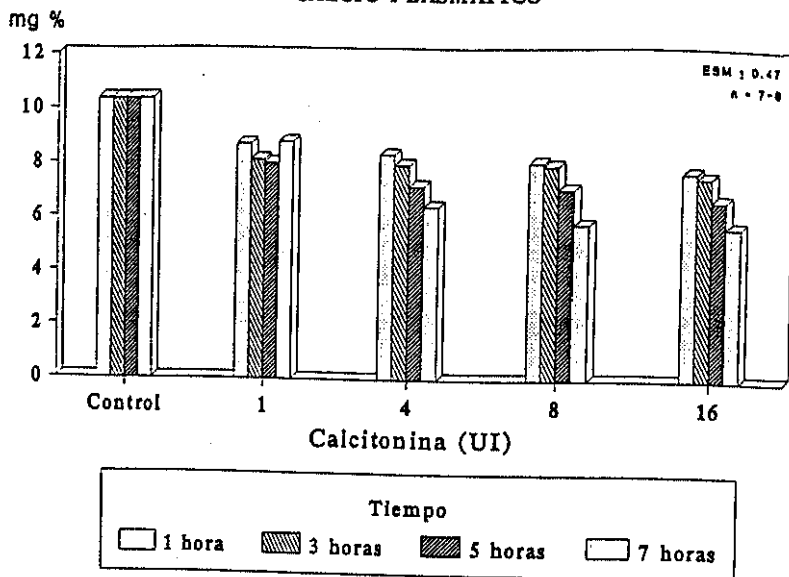


FIGURA 11.- Calcio plasmático en ratas después de la inducción de hipocalcemia aguda con diferentes dosis de calcitonina i.p.

ESM = Error standard de la media.

n = nº de determinaciones.

Ver significación estadística en Tabla VI, pag. 75.

INDUCCION HIPOCALCEMIA AGUDA CALCIO IONICO

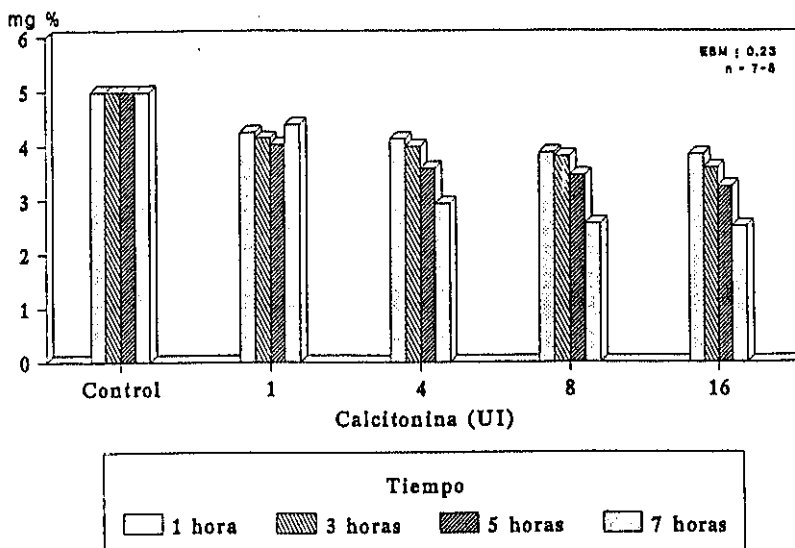


FIGURA 12.- Calcio iónico en ratas después de la inducción de hipocalcemia aguda con diferentes dosis de calcitonina i.p.

ESM = Error standard de la media.

n = nº de determinaciones.

Ver significación estadística en Tabla VI, pag. 75.

4.2. MODELOS DE HIPERCALCEMIA EN RATAS

4.2.1. MODELOS DE HIPERCALCEMIA AGUDA

Después de la administración i.p. de Cl_2Ca (1.1-17.6 mg Ca/100 g) en ratas se apreció un aumento de la calcemia y de los valores de calcio iónico en plasma. En todos los grupos establecidos apareció hipercalcemia 5 minutos después de la inyección, permaneciendo aún la calcemia elevada 2 horas después. El nivel máximo de calcio se detectó 30 minutos después de las inyecciones. Ver Tablas VII y VIII (pags. 79 y 81), y Figuras 13 y 14 (pags. 80 y 82).

Cuando la cantidad de calcio elemento administrado era igual o mayor de 13.2 mg/100 g aparecieron síntomas de toxicidad, y en ocasiones la muerte del animal. Entre los síntomas de toxicidad observados figuran: dificultad respiratoria, ataxia, incoordinación motora, piloerección, y en algún caso marcada agresividad. Por otra parte hemos observado una disminución de los valores de proteínas totales, y de la cantidad de sangre recogida al sacrificar las ratas después de la administración aguda de calcio. La disminución de ambos parámetros era más acusada con dosis más altas de calcio, y se apreciaba mejor cuanto más tiempo transcurría después de la inyección hasta el sacrificio del animal. Ver Tablas IX y X (pags. 83 y 85), y Figuras 15 y 16 (pags. 84 y 86). En algunos casos la cantidad de sangre recogida no fué suficiente para permitir las determinaciones analíticas. Concretamente en el grupo tratado con 13.2 mg Ca/100 g no se consiguieron cantidades de sangre suficientes para hacer determinaciones 2 horas después de la inyección, y además únicamente 8 de las 10 ratas inyectadas permanecían con vida en ese momento. En el grupo tratado con 17.6 mg Ca/100 g fué necesario heparinizar a los animales para conseguir muestras de sangre adecuadas 30 minutos después de la inyección, y además en éste momento únicamente 7 de las 10 ratas inyectadas permanecían con vida.

TABLA VII

CALCIO PLASMÁTICO (mg%) EN RATAS DESPUES DE LA INDUCCION DE HIPERCALCEMIA AGUDA CON DIFERENTES DOSIS DE Cl_2Ca i.p.

TRATAMIENTO Ca mg/100g	TIEMPO (min)					
	5	15	30	60	90	120
1.1	*** 12.18±0.19	*** 11.45±0.08	*** 11.11±0.16	*** 11.17±0.08	** 10.80±0.12	* 10.74±0.20
2.2	*** 14.60±0.16	*** 14.86±0.26	*** 14.71±0.30	*** 11.70±0.21	*** 11.63±0.27	** 10.93±0.20
4.4	*** 15.79±0.43	*** 18.11±0.50	*** 18.64±0.31	*** 13.93±0.44	*** 12.72±0.23	*** 11.93±0.37
8.8	*** 17.66±0.40	*** 20.73±0.60	*** 22.57±0.70	*** 21.32±0.55	*** 17.40±0.50	*** 16.08±0.60
13.2			*** 28.55±0.63			
17.6			*** 40.13±0.84			

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas

- Calcio plasmático grupo control: 10.38±0.06 mg%

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

INDUCCION HIPERCALCEMIA AGUDA CALCIO PLASMATICO

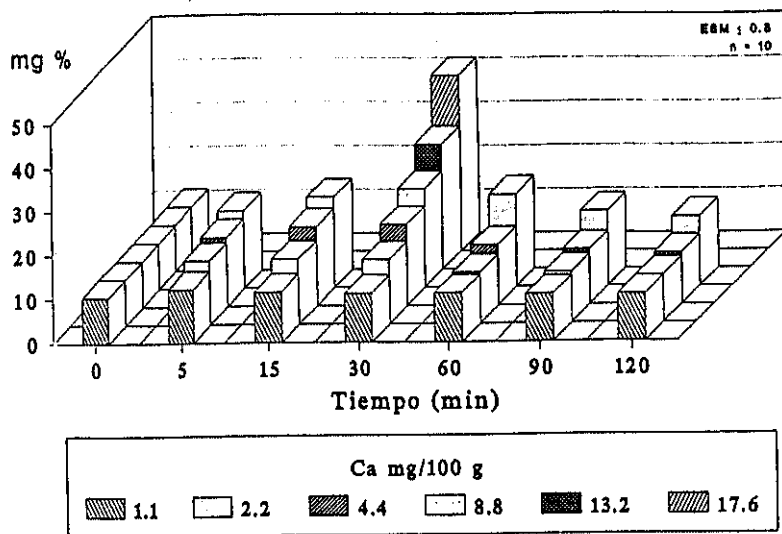


FIGURA 13.- Calcio plasmático en ratas después de la inducción de hipercalcemia aguda con diferentes dosis de Cl_2Ca i.p.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de determinaciones.

En el tiempo 0 se representa el valor obtenido en el grupo de ratas control.

Ver significación estadística en Tabla VII, pag 79.

TABLA VIII

CALCIO IONICO (mg%) EN RATAS DESPUES DE LA INDUCCION DE HIPERCALCEMIA AGUDA CON DIFERENTES DOSIS DE Cl₂Ca i.p.

TRATAMIENTO Ca mg/100g	TIEMPO (min)					
	5	15	30	60	90	120
1.1	6.04±0.09 ^{***}	5.72±0.03 ^{***}	5.66±0.06 ^{***}	5.63±0.01 ^{***}	5.54±0.08 ^{***}	5.44±0.06 ^{***}
2.2	7.41±0.08 ^{***}	7.41±0.13 ^{***}	7.56±0.19 ^{***}	5.95±0.08 ^{***}	5.87±0.14 ^{***}	5.52±0.09 ^{***}
4.4	7.87±0.27 ^{***}	9.29±0.25 ^{***}	10.01±0.13 ^{***}	7.36±0.23 ^{***}	6.91±0.13 ^{***}	6.59±0.23 ^{***}
8.8	9.01±0.20 ^{***}	10.93±0.22 ^{***}	12.14±0.44 ^{***}	11.77±0.32 ^{***}	10.16±0.28 ^{***}	9.20±0.33 ^{***}
13.2			15.46±0.32 ^{***}			
17.6			22.45±0.43 ^{***}			

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas

- Calcio iónico grupo control: 4.99±0.04 mg%

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

INDUCCION HIPERCALCEMIA AGUDA CALCIO IONICO

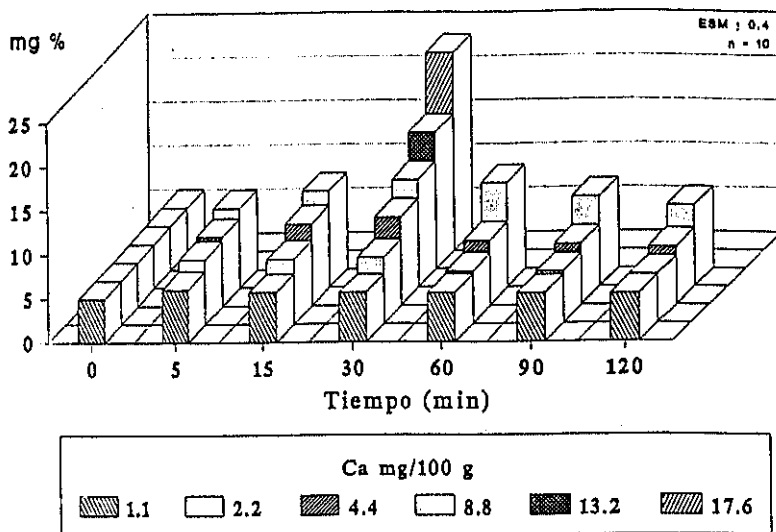


FIGURA 14.- Calcio iónico en ratas después de la inducción de hipercalcemia aguda con diferentes dosis de Cl_2Ca i.p.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de determinaciones.

En el tiempo 0 se representa el valor obtenido en el grupo de ratas control.
Ver significación estadística en Tabla VIII, pag 81.

TABLA IX

PROTEINAS TOTALES (g) EN RATAS DESPUES DE LA INDUCCION DE HIPERCALCEMIA AGUDA CON DIFERENTES DOSIS DE Cl₂Ca i.p.

TRATAMIENTO Ca mg/100g	TIEMPO (min)					
	5	15	30	60	90	120
1.1	5.76±0.06 **	5.67±0.04 ***	5.44±0.06 ***	5.56±0.08 ***	5.37±0.09 ***	5.50±0.12 ***
2.2	5.57±0.09 ***	5.77±0.07 **	5.45±0.07 ***	5.48±0.10 ***	5.55±0.10 ***	5.56±0.07 ***
4.4	5.82±0.13	5.50±0.03 ***	5.00±0.11 ***	5.13±0.13 ***	4.81±0.13 ***	4.64±0.11 ***
8.8	5.61±0.11 ***	5.19±0.12 ***	4.95±0.17 ***	4.74±0.09 ***	4.13±0.11 ***	4.32±0.09 ***
13.2			4.97±0.16 ***			
17.6			4.65±0.08 ***			

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas

- Proteinas totales grupo control: 6.09±0.07 g

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

INDUCCION HIPERCALCEMIA AGUDA PROTEINAS TOTALES

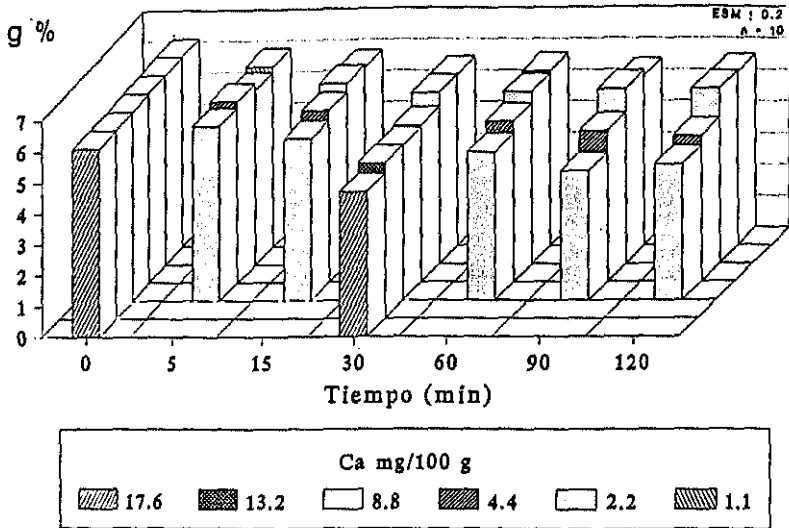


FIGURA 15.- Proteínas totales en ratas después de la inducción de hipercalcemia aguda con diferentes dosis de Cl_2Ca i.p.

ESM = Error estándar de la media.

n = nº de determinaciones.

En el tiempo 0 se representa el valor obtenido en el grupo de ratas control.

Ver significación estadística en Tabla IX, pag 83.

TABLA X

VOLUMEN DE SANGRE (cc) RECOGIDA EN RATAS DESPUES DE LA INDUCCION DE HIPERCALCEMIA AGUDA CON DIFERENTES DOSIS DE Cl_2Ca i.p.

TRATAMIENTO Ca mg/100g	TIEMPO (min)					
	5	15	30	60	90	120
1.1	8.96±0.22 *	7.93±0.18 ***	7.49±0.10 ***	7.24±0.26 ***	7.12±0.15 ***	7.06±0.12 ***
2.2	8.65±0.18 ***	7.61±0.10 ***	7.24±0.32 ***	7.10±0.13 ***	6.24±0.22 ***	6.39±0.31 ***
4.4	8.56±0.16 ***	7.37±0.12 ***	6.37±0.26 ***	6.75±0.40 ***	5.37±0.35 ***	5.31±0.39 ***
8.8	8.06±0.17 ***	5.39±0.24 ***	4.49±0.29 ***	3.99±0.28 ***	2.62±0.24 ***	2.48±0.20 ***
13.2			3.68±0.23 ***			
17.6			(1) 3.30±0.35 ***			

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas

- Volumen de sangre recogida grupo control: 9.60±0.13 cc

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

(1) Heparina 150 UI/kg

INDUCCION HIPERCALCEMIA AGUDA SANGRE RECOGIDA

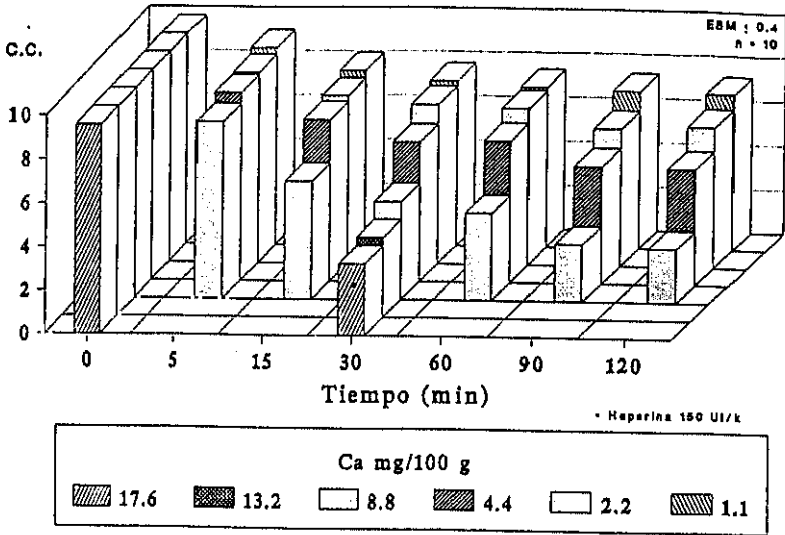


FIGURA 16.- Volumen de sangre recogida después de la inducción de hipercalcemia aguda en ratas, con diferentes dosis de Cl_2Ca i.p.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de determinaciones.

En el tiempo 0 se representa el valor obtenido en el grupo de ratas control.

Ver significación estadística en Tabla X, pag 85.

4.2.2. MODELOS DE HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

El incremento del consumo de calcio por vía oral ocasionó en las ratas un aumento de la calcemia y de los valores de calcio iónico en plasma. Pudo conseguirse la elevación del calcio en sangre aumentando el contenido de calcio en la dieta sólida, y también aumentando el contenido de calcio en la dieta líquida de los animales.

Se consiguieron valores de calcio plasmático y de calcio iónico elevados en las ratas a las que proporcionábamos harina con suplemento de CO_3Ca . Cuando el CO_3Ca se añadía en la dieta sólida hasta conseguir una concentración del 4% de calcio elemento resulto paradójicamente mayor el incremento de calcio en sangre, que cuando se añadía CO_3Ca en la dieta sólida hasta conseguir una concentración del 8%. La inyección por vía i.m. de 100000 U.I. de Vit D_3 incrementa los valores de calcio plasmático y de calcio iónico obtenidos después de estos tratamientos con CO_3Ca . El efecto de la Vit D_3 se apreció más en los tratamientos con más concentración de CO_3Ca . Dos días después de comenzar los tratamientos con CO_3Ca , apareció ya una elevación de la calcemia y del calcio iónico, y los valores máximos en ese momento se consiguieron en las ratas tratadas con Vit D_3 y alimentadas con dieta sólida que contenía un 8% de calcio elemento. Los niveles de calcio plasmático y calcio iónico de todas las ratas que consumían CO_3Ca en la dieta sólida permanecieron elevados 14 días después de comenzar el tratamiento, pero resultaron en ese momento inferiores a los valores obtenidos 2 días después de comenzar el mismo. Catorce días después de comenzar los tratamientos los valores más altos de calcio plasmático aparecían en las ratas alimentadas con la dieta que contenía un 4% de calcio elemento, resultando en ese momento además similares los valores en las ratas tratadas con Vit D_3 y en las ratas que no se habían tratado con Vit D_3 . Los datos numéricos correspondientes a estos resultados aparecen recopilados en la Tabla XI (pag. 90), y representados en las figuras 17 y 18 (pags. 91 y 92) (grupos I, II, III y IV).

Hay que señalar que las ratas alimentadas con harina enriquecida en calcio, mostraron un retraso en el crecimiento, por lo que 14 días después de comenzados los tratamientos su peso era menor que el peso de las ratas control de la misma edad. La diferencia de peso con el grupo control era más acusada en las ratas alimentadas con la dieta más rica en calcio. Las ratas del grupo I fueron las que mostraron un crecimiento mejor. Los datos numéricos correspondientes a la evolución ponderal de las ratas alimentadas con harina enriquecida en calcio aparecen recopilados en la Tabla XII (pag. 93) (grupos I, II, III y IV), y aparecen representados en la figura 19 (pag. 94). El consumo de harina estimado en las ratas sometidas a tratamiento con CO_3Ca fué menor que el

consumo de harina estimado en las ratas del grupo control, siendo menor la ingesta cuando se incrementaba más el calcio de la dieta. El consumo de agua en las ratas tratadas con calcio en la dieta sólida fué similar al consumo de agua del grupo control. En la Tabla XIII (pag. 97) aparece el consumo medio estimado de dieta sólida y de dieta líquida de las ratas alimentadas con harina enriquecida en calcio; la representación correspondiente a estos datos aparece en la figura 22 (pag. 98) (grupos I, II, III y IV).

El incremento de calcio en la dieta líquida ocasionó una elevación de la calcemia y del calcio iónico en plasma que pudo también apreciarse 2 días después de comenzar el tratamiento en las ratas. Esta elevación fué más señalada cuando el tratamiento de calcio se llevó a cabo sustituyendo el agua de bebida por una solución de Cl_2Ca , que cuando el tratamiento se llevó a cabo mediante sustitución del agua de bebida por una solución de pidolato de calcio. Los valores de calcio plasmático y de calcio iónico aún permanecían elevados 14 días después de comenzar el tratamiento con Cl_2Ca , pero eran inferiores a los valores obtenidos 2 días después de comenzar dicho tratamiento. Paradójicamente se obtenían mayores valores de calcio plasmático y de calcio iónico en plasma cuando la cantidad de Cl_2Ca en la dieta líquida era menor. Además todas las ratas tratadas con Cl_2Ca mostraron un retraso en el crecimiento, siendo éste más acusado en las ratas tratadas con mayor cantidad de este compuesto. Pudo apreciarse también una disminución del consumo de comida y bebida en las ratas tratadas con Cl_2Ca , siendo el consumo de ambas dietas, sólida y líquida, menor en las ratas que ingerían mayor cantidad de calcio.

Todas las ratas sometidas a tratamiento con pidolato de calcio mostraron un retraso muy acusado del crecimiento, apreciándose una mortalidad muy elevada en el grupo de ratas tratadas con mayor cantidad de pidolato de calcio, (grupo VII). El 90 % de estas ratas morían antes de transcurrir 14 días de tratamiento, y por ello en éste grupo no pudimos hacer determinaciones analíticas en ese momento. Pudimos sin embargo, constatar un incremento del calcio plasmático y del calcio iónico 14 días después de sustituir el agua de bebida por una solución de pidolato de calcio con una concentración de 1.5% de calcio elemento.

Las ratas a las que se les sustituía el agua natural por una solución de pidolato de calcio bebían aún menos que las ratas a las que se les sustituía el agua natural por una solución de Cl_2Ca . Podía apreciarse también un descenso más acusado en la ingesta de harina en las ratas tratadas con pidolato de calcio que en las ratas tratadas con Cl_2Ca .

Los datos numéricos de calcio plasmático y calcio iónico en las ratas tratadas con calcio en la dieta líquida aparecen recopilados en la Tabla XI (pag. 90), y se representan en las figuras 17 y 18 (pags. 91 y 92) (grupos V, VI, VII y VIII).

Los datos numéricos correspondientes a la evolución ponderal de las ratas sometidas a tratamiento con calcio en la dieta líquida aparecen recopilados en la Tabla XII (pag. 93) (grupos V, VI, VII y VIII), y aparecen representados en la figura 20 (pag. 95).

Los consumos medios estimados de dieta sólida y de dieta líquida en ratas tratadas durante 14 días con sales de calcio en la dieta líquida aparecen en la Tabla XIII (pag. 97), y se representan en la figura 22 (pag. 98) (grupos V, VI, VII y VIII).

Cuando incrementamos el contenido de calcio en la dieta sólida añadiendo CO_3Ca hasta conseguir una concentración del 4% de calcio elemento en la misma, y sustituíamos además el agua de bebida por una solución de Cl_2Ca consiguiendo una concentración de 1.5% de calcio elemento, produjimos una elevación del calcio plasmático y del calcio iónico en las ratas, que lógicamente podía también apreciarse 2 días después de comenzar el tratamiento. Además, cuando se administró el calcio en la comida y en la bebida, se consiguió mantener su nivel elevado en sangre mejor que cuando se administraba únicamente en la comida, o únicamente en la bebida. Es decir, que las determinaciones analíticas efectuadas a los 14 días de comenzar el tratamiento en el que se aportaba calcio en ambas dietas, sólida y líquida, proporcionaban cifras mayores de calcio en sangre que las determinaciones analíticas efectuadas 14 días después de comenzar cualquiera de los restantes tratamientos. Los valores de calcio plasmático y calcio iónico 2 y 14 días después del tratamiento con calcio en ambas dietas, sólida y líquida, aparecen en la Tabla XI (pag. 90), y se representan en las figuras 17 y 18 (pags. 91 y 92) (grupo IX). Las ratas de este grupo también comían y bebían menos que las del grupo control, y mostraron un retraso en el crecimiento más acusado que las ratas en las que el calcio se aportaba únicamente en la dieta sólida. El retraso del crecimiento fue también mayor que el de las ratas que consumía Cl_2Ca en la dieta líquida. Los datos numéricos correspondientes a la evolución ponderal de las ratas de este grupo aparecen recopiladas en la Tabla XII (pag. 93) (grupo IX), y aparecen representados en la figura 21 (pag. 96). El correspondiente consumo medio estimado de dieta sólida y de dieta líquida de estas ratas aparece en la Tabla XIII (pag. 97), y se representa en la figura 22 (pag. 98) (grupo IX).

La cantidad de sangre recogida en las ratas sacrificadas después del tratamiento durante 2 y 14 días fue siempre menor que la cantidad de sangre recogida en el grupo control. Pero hay que tener en cuenta que los tratamientos se iniciaban con ratas de 140-160 g y 7 semanas de vida, y que mostraron un retraso en el crecimiento, alcanzando menor peso que las ratas control cuando se sacrificaban con 9 semanas de vida. Se recogió más cantidad de sangre en las ratas con un crecimiento más próximo al del grupo control. Los valores de proteínas totales fueron siempre muy parecidos en todos los grupos.

TABLA XI

CALCIO PLASMÁTICO Y CALCIO IÓNICO EN RATAS DESPUÉS DE TRATAMIENTO DURANTE 2 Y 14 DÍAS CON DIFERENTES SALES DE CALCIO Y VIT. D₃.

(1) (Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

(1) GRUPO	2 DIAS		14 DIAS	
	CALCIO PLASMÁTICO (mg%)	CALCIO IÓNICO (mg%)	CALCIO PLASMÁTICO (mg%)	CALCIO IÓNICO (mg%)
CONTROL	10.38±0.06	4.99±0.04	10.38±0.06	4.99±0.04
	***	***	***	***
I	13.00±0.14	6.51±0.05	12.30±0.11	5.94±0.07
	***	***	***	***
II	13.67±0.31	6.74±0.18	12.49±0.06	6.09±0.03
	***	***	***	***
III	12.59±0.31	6.42±0.11	11.82±0.15	6.07±0.09
	***	***	***	***
IV	14.38±0.22	7.17±0.10	11.11±0.19	5.72±0.07
	***	***	*	**
V	12.04±0.13	5.90±0.06	10.82±0.21	5.36±0.07
	***	***	***	***
VI	12.48±0.19	6.68±0.09	11.74±0.11	5.95±0.06
	***	***	---	---
VII	10.87±0.05	4.86±0.02	---	---
	***	***	***	***
VIII	11.35±0.16	5.42±0.09	12.59±0.22	6.07±0.15
	***	***	***	***
IX	12.74±0.12	6.71±0.05	13.39±0.24	6.67±0.15

Los datos representan la media ± error standard de la media para 7-8 ratas.

* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONIC CALCIO PLASMATICO

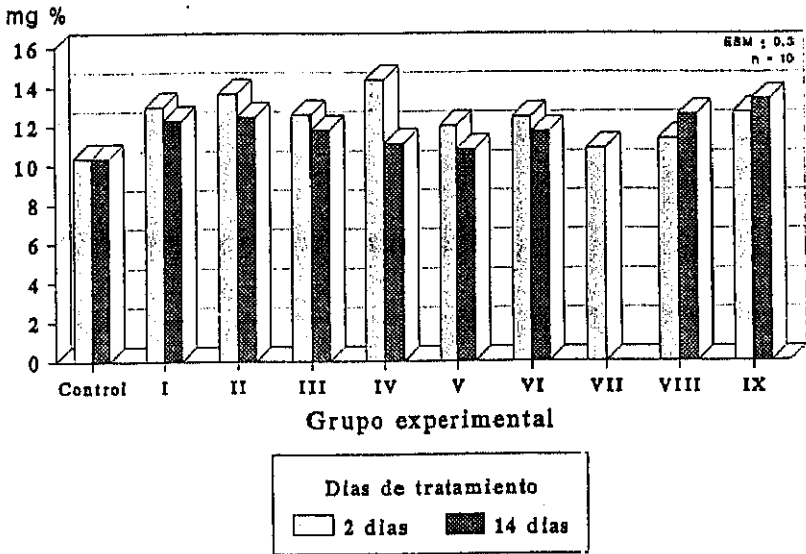


FIGURA 17.- Calcio plasmático en ratas después de tratamiento con sales de calcio y vitamina D. Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de ratas de cada grupo.

Ver significación estadística en Tabla XI, pag. 90.

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONICA CALCIO IONICO

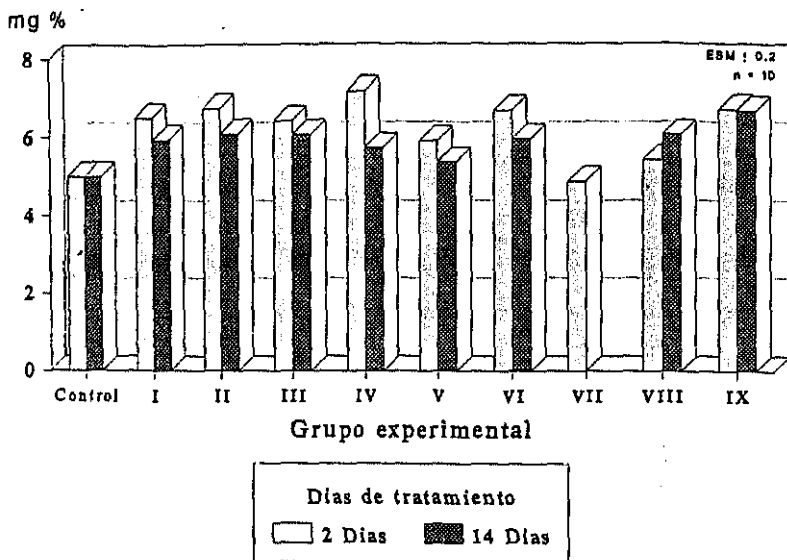


FIGURA 18.- Calcio iónico en ratas después de tratamiento con sales de calcio y vitamina

D. Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66.

ESM = Error standard de la media.

n = nº de ratas de cada grupo.

Ver significación estadística en Tabla XI, pag. 90.

TABLA XII

VARIACION DEL PESO CORPORAL DE RATAS (g), DURANTE EL TRATAMIENTO CON DIFERENTES SALES DE CALCIO Y VIT. D,
(1)(Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

(1) GRUPO	DIAS DE TRATAMIENTO							
	0	2	4	6	8	10	12	14
CONTROL	148.1±1.80	162.6±3.36	169.1±3.97	181.5±3.16	192.2±3.17	209.4±2.79	224.8±3.30	243.2±4.73
I	157.9±1.68	159.9±1.91	161.3±2.00	170.3±3.20	175.7±2.77	187.7±3.61	198.4±3.65	209.9±3.39
II	152.7±2.51	147.3±2.44	142.3±3.32	152.1±3.60	160.7±3.50	168.5±3.36	177.9±3.48	190.8±4.28
III	148.5±1.79	142.8±2.37	139.9±1.88	148.3±1.90	151.1±1.37	157.8±1.98	167.2±2.93	178.9±4.08
IV	150.2±1.37	135.4±2.01	133.7±1.70	138.6±2.14	152.7±2.97	161.3±2.22	167.1±2.02	175.9±1.67
V	152.3±1.31	149.4±1.83	146.9±2.22	147.2±2.27	150.6±2.15	157.1±2.16	163.7±2.18	173.6±2.40
VI	157.1±1.90	159.2±2.87	165.7±4.61	173.1±6.61	184.7±4.29	199.4±5.03	207.8±4.69	215.9±4.50
VII	150.9±1.91	130.5±2.08	113.3±4.14	91.2±1.73	80.0±1.22	72.8±1.31	69.3±1.85	66
VIII	147.5±1.91	140.2±1.72	133.3±1.80	129.8±1.64	129.4±1.63	129.4±2.16	132.2±3.24	132.3±4.03
IX	149.8±1.92	140.0±2.67	139.4±2.06	138.9±1.95	147.5±2.92	154.1±3.78	157.9±3.63	162.8±3.43

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas, excepto para el Grupo VII en el que los datos corresponden a las ratas que permanecían con vida en los días siguientes: día 8, n=8; día 10, n=5; día 12, n=3; y día 14, n=1.

La diferencia de peso observada al final de los distintos tratamientos respecto al grupo control fué en todos los grupos estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONICA PESOS

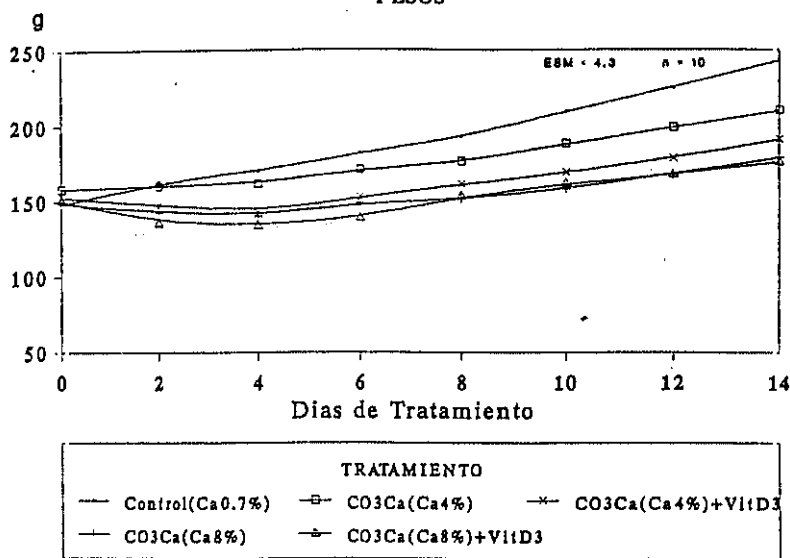


FIGURA 19.- Variación del peso corporal de ratas tratadas con CO₃Ca en la dieta sólida y alternativamente además 100000 U.I. de Vit D₃.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de ratas de cada grupo.

Ver significación estadística en Tabla XII, pag. 93.

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONICA PESOS

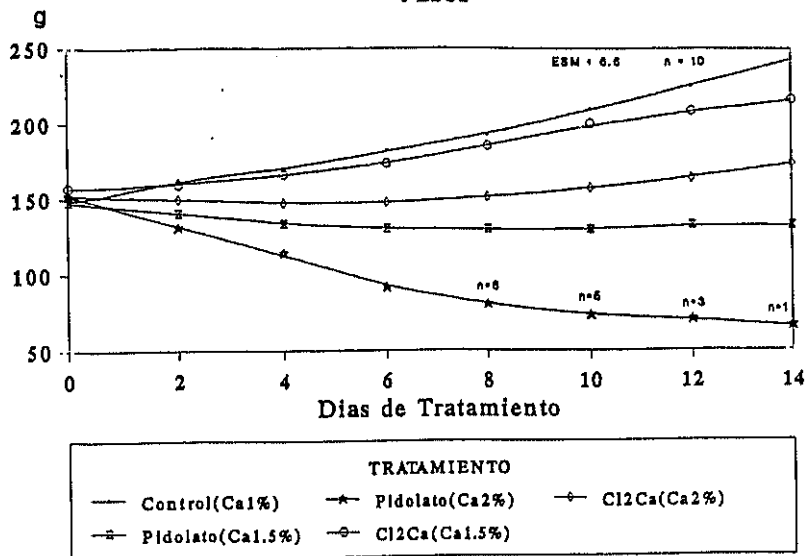


FIGURA 20.- Variación del peso corporal de ratas tratadas con sales de calcio en la dieta líquida.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de ratas de cada grupo. Excepcionalmente cuando morían ratas en el curso del tratamiento se expresa el n° de ratas supervivientes.

Ver significación estadística en Tabla XII, pag. 93.

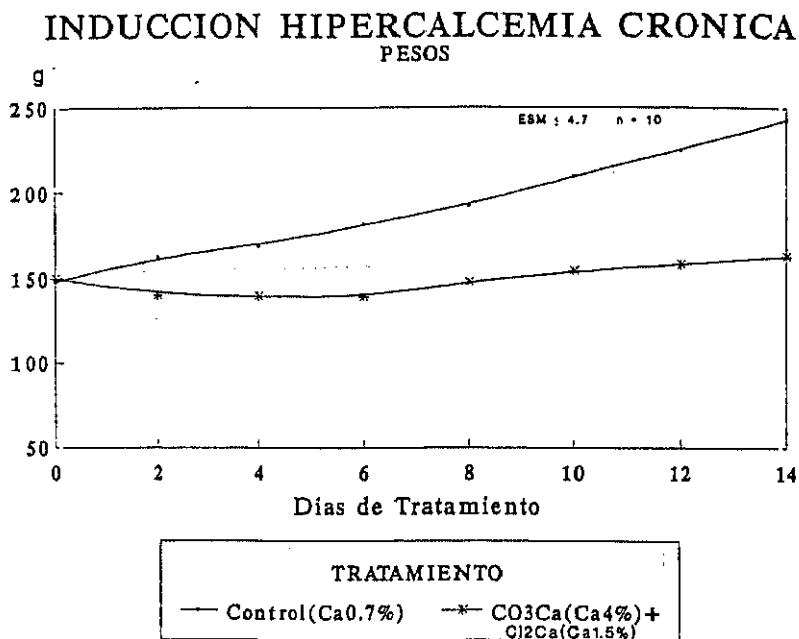


FIGURA 21.- Variación del peso corporal de ratas control y ratas tratadas con CO₃Ca en la dieta sólida y Cl₂Ca en la dieta líquida.

ESM = Error standard de la media.

n = n° de ratas de cada grupo.

Ver significación estadística en Tabla XII, pag. 93.

TABLA XIII

CONSUMO MEDIO ESTIMADO DE DIETA SOLIDA Y DE DIETA LIQUIDA
EN RATAS TRATADAS DURANTE 14 DIAS CON DIFERENTES SALES DE
CALCIO Y VIT. D₃.

(1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

(1) GRUPO	DIETA SOLIDA g/rata/día	DIETA LIQUIDA ml/rata/día
CONTROL	21.30	30.30
I	19.02	28.76
II	18.34	27.71
III	15.62	33.53
IV	15.40	32.42
V	14.80	23.60
VI	17.65	29.80
VII	0.70	2.50
VIII	5.71	6.88
IX	15.20	27.10

INDUCCION HIPERCALCEMIA SUBCRONICA CONSUMO ESTIMADO

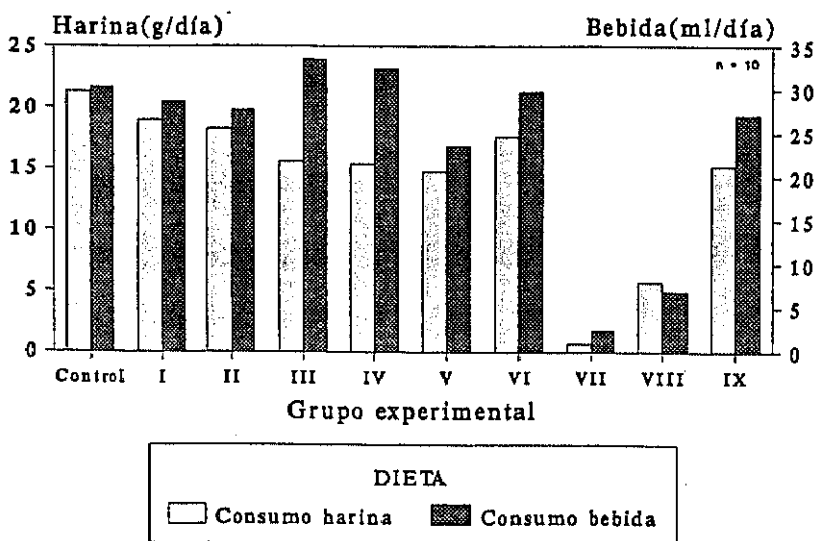


FIGURA 22.- Consumo estimado de dieta sólida y de dieta líquida enriquecidas con sales de calcio en los distintos grupos experimentales. (Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

n = n° de ratas de cada grupo.

Cuando incrementábamos el contenido de calcio en la dieta sólida añadiendo CO_3Ca hasta conseguir una concentración del 4% de calcio elemento en la misma, y sustituíamos además al agua de bebida por una solución de Cl_2Ca consiguiendo una concentración de 1.5% de calcio elemento (tratamiento del grupo experimental IX de hipercalcemia subcrónica de la tabla IV, pag 66, descrito también en el párrafo anterior), pudimos apreciar que disminuía la presión arterial de las ratas. Dos días después de iniciar este tratamiento las ratas acusaban una reducción muy considerable de la PAS y PAD. Catorce días después de iniciar este tratamiento las ratas tenían también valores de PAS y PAD menores que las ratas control, aunque el descenso en la presión arterial no era tan acusado como en las ratas tratadas 2 días.

Las ratas que mantuvieron un tratamiento con sales de calcio por vía oral durante 2 meses, presentaron cifras de calcio plasmático, y calcio iónico, ligeramente menores que las obtenidas en las ratas que se sacrificaron 14 días después de comenzar este tratamiento, pero los valores de PAS y de PAD fueron muy similares a los valores de PAS y PAD en ratas tratadas 14 días.

Los valores de PTH fueron muy similares a los de las ratas control en todas las determinaciones llevadas a cabo en el curso del tratamiento (ver tabla XIV, pag. 100).



TABLA XIV

CALCIO PLASMÁTICO, CALCIO IÓNICO, PARATHORMONA, Y PRESION ARTERIAL SISTOLICA (PAS) / PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (PAD), EN RATAS CONTROL, DESPUES DE TRATAMIENTO SUBCRONICO (2 Y 14 DIAS), Y DESPUES DE TRATAMIENTO CRONICO (2 MESES), CON CO₂Ca (Ca 4%) EN LA DIETA SOLIDA Y Cl₂Ca (Ca 1.5%) EN LA DIETA LIQUIDA (GRUPO EXPERIMENTAL IX) (Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

	Ca mg%	PTH	PAS/PAD
	Plasmático	Iónico	pg/ml
			mm Hg
Control	10.38 ± 0.06	4.99 ± 0.04	14.42 ± 1.62
			159.40 ± 8.83
			126.00 ± 5.64
Hipercalcemia subcrónica (Tto. 2 días)	12.74 ± 0.12 ***	6.71 ± 0.05 ***	15.51 ± 0.83
			85.16 ± 1.13 ***
			67.66 ± 2.30
Hipercalcemia subcrónica (Tto. 14 días)	13.39 ± 0.24 ***	6.67 ± 0.15 ***	14.57 ± 1.13
			111.60 ± 3.67 ***
			84.80 ± 2.89
Hipercalcemia crónica (Tto. 2 meses)	11.33 ± 0.17 ***	5.34 ± 0.07 ***	15.44 ± 0.92
			110.00 ± 6.03 ***
			84.10 ± 6.74

Los datos representan la media ± error standard de la media para 10 ratas.

* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001

4.3. RESULTADOS EN "PITHED-RAT"

4.3.1. RATAS CON HIPOCALCEMIA

Después de ocasionar un descenso agudo de la calcemia los incrementos presores producidos por los agonistas α en la preparación de "pithed-rat" fueron menores. La diferencia con los incrementos presores en ratas control fué más acentuada cuando el grado de hipocalcemia era mayor.

Cuando la concentración de calcio iónico en plasma era de 4.14 ± 0.05 mg%, los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina fueron menores que los incrementos en ratas control, presentando los incrementos presores producidos por las dosis intermedias del fármaco diferencias significativas.

Cuando la concentración de calcio iónico en plasma era de 3.59 ± 0.12 mg%, los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina fueron aún menores, existiendo en este caso diferencia significativa con los incrementos producidos por todas las dosis del fármaco en ratas control. Ver tablas XV y XVI (pag 102, y 104), y figuras 23 y 24 (pag 103, y 105).

TABLA XV

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN "PITHED-RAT", EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPOCALCEMIA

METOXAMINA $\mu\text{g/kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPOCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	4.14 \pm 0.05	3.59 \pm 0.12
10	17.00 \pm 1.23	16.66 \pm 2.29	8.83 \pm 1.70
30	36.83 \pm 2.60	26.86 \pm 1.75**	20.00 \pm 3.18**
100	109.71 \pm 6.57	75.50 \pm 5.93**	59.80 \pm 8.25***
300	158.50 \pm 5.56	132.83 \pm 7.36*	95.20 \pm 5.65***
1000	183.83 \pm 5.17	171.16 \pm 7.55	128.60 \pm 14.9**
3000	201.66 \pm 3.48	190.50 \pm 5.08	130.40 \pm 15.3***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

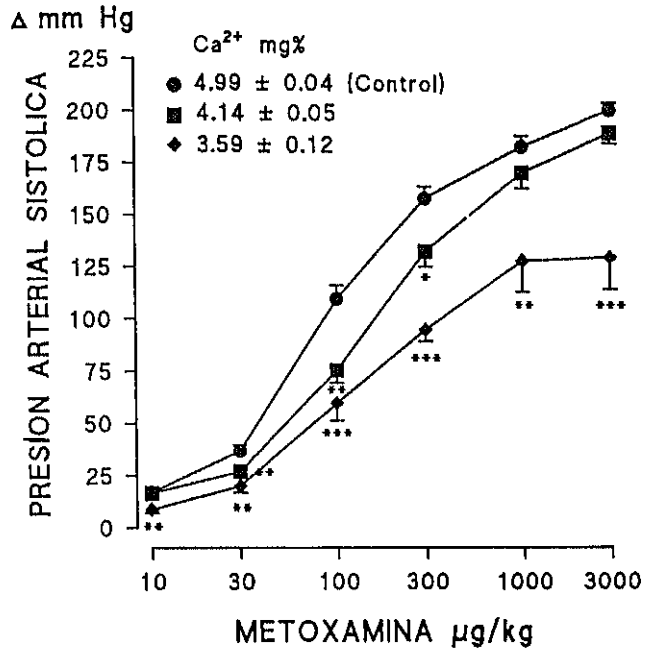


FIGURA 23.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por metoxamina en "pithed-rat", en ratas control y en ratas con dos niveles de hipocalcemia.

Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

TABLA XVI

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPOCALCEMIA

METOXAMINA µg/kg	CONTROL (Ca ²⁺ -mg%)	HIPOCALCEMIA (Ca ²⁺ -mg%)	
	4.99 ± 0.04	4.14 ± 0.05	3.59 ± 0.12
10	14.00 ± 1.03	13.66 ± 2.87	6.60 ± 1.07***
30	32.83 ± 2.57	24.33 ± 1.35*	14.50 ± 1.96***
100	82.71 ± 5.40	60.50 ± 2.20**	44.00 ± 4.12***
300	109.00 ± 2.96	95.00 ± 3.29*	69.00 ± 2.70***
1000	112.83 ± 4.02	116.83 ± 4.51	68.40 ± 5.59***
3000	120.16 ± 3.68	124.50 ± 2.59	73.60 ± 5.67***

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

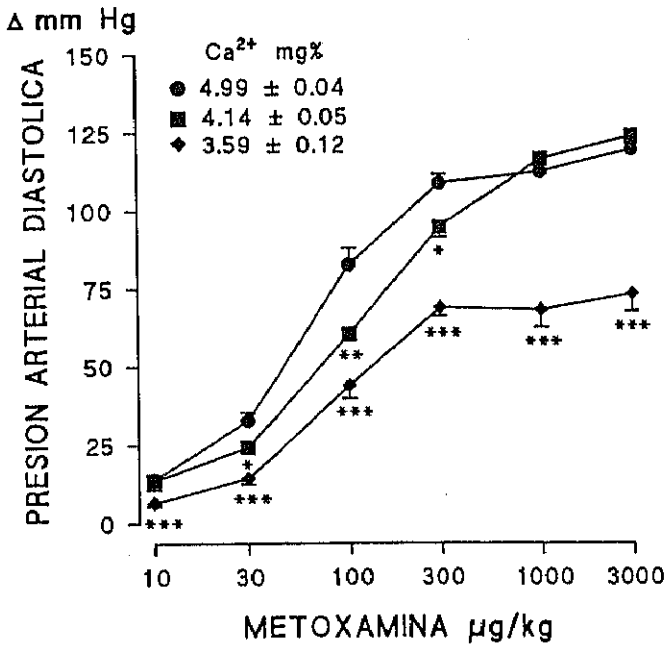


FIGURA 24.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por metoxamina en ratas control y ratas con dos niveles de hipocalcemia, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

Las ratas hipocalcémicas mostraron también menor incremento de la PAS y de la PAD cuando se administraba B-HT 920 en la preparación de "pithed-rat". Cuando se utilizaban en ratas hipocalcémicas las dosis menores de B-HT 920 (1-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), existió diferencia significativa con los incrementos presores en ratas control, siendo por otra parte similar la diferencia con los dos valores de calcio iónico en plasma estudiados ($4.14 \pm 0.05 \text{ mg}\%$ y $3.59 \pm 0.12 \text{ mg}\%$). Ver tablas XVII y XVIII (pag 107 y 109), y figuras 25 y 26 (pag 108 y 110).

TABLA XVII

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPOCALCEMIA

B-HT 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPOCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	4.14 \pm 0.05	3.59 \pm 0.12
1	21.80 \pm 3.28	7.83 \pm 1.16**	6.42 \pm 0.89***
3	27.88 \pm 2.88	14.33 \pm 1.33**	11.57 \pm 2.49**
10	39.10 \pm 1.73	24.83 \pm 0.87***	19.42 \pm 2.30***
30	62.86 \pm 2.54	46.83 \pm 3.43**	37.14 \pm 6.32**
100	95.51 \pm 4.86	78.60 \pm 7.12	76.57 \pm 8.23
300	108.20 \pm 5.07	95.50 \pm 6.63	94.14 \pm 8.50
1000	111.15 \pm 5.11	103.83 \pm 8.63	101.14 \pm 8.91

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

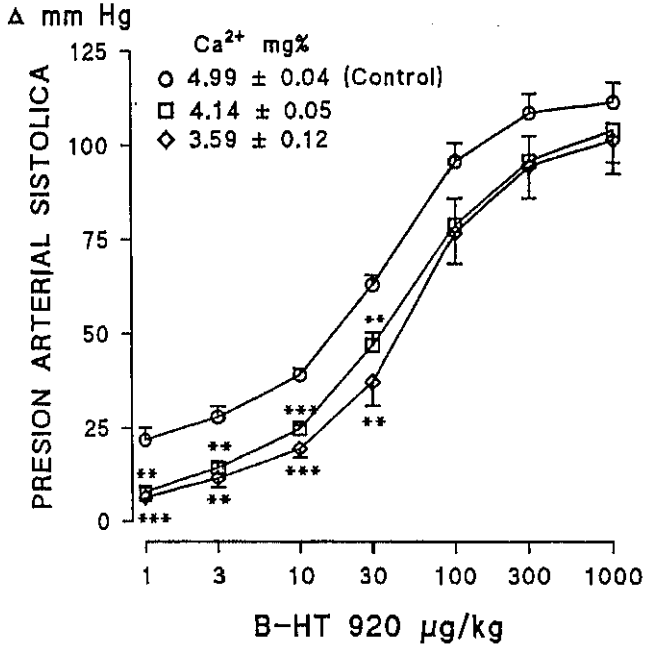


FIGURA 25.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por B-HT 920 en ratas control y ratas con dos niveles de hipocalcemia, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TABLA XVIII

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPOCALCEMIA

B-HT 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPOCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	4.14 \pm 0.05	3.59 \pm 0.12
1	19.73 \pm 3.27	6.33 \pm 0.84**	5.71 \pm 0.56***
3	24.88 \pm 2.46	12.16 \pm 1.22***	10.85 \pm 1.85***
10	38.75 \pm 3.51	23.16 \pm 1.79**	21.57 \pm 3.64**
30	52.13 \pm 4.66	40.00 \pm 2.92	35.00 \pm 4.67*
100	69.68 \pm 4.18	59.83 \pm 3.78	59.87 \pm 5.90
300	77.15 \pm 3.36	70.50 \pm 3.63	75.71 \pm 4.45
1000	79.01 \pm 2.87	75.50 \pm 4.55	81.14 \pm 5.66

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

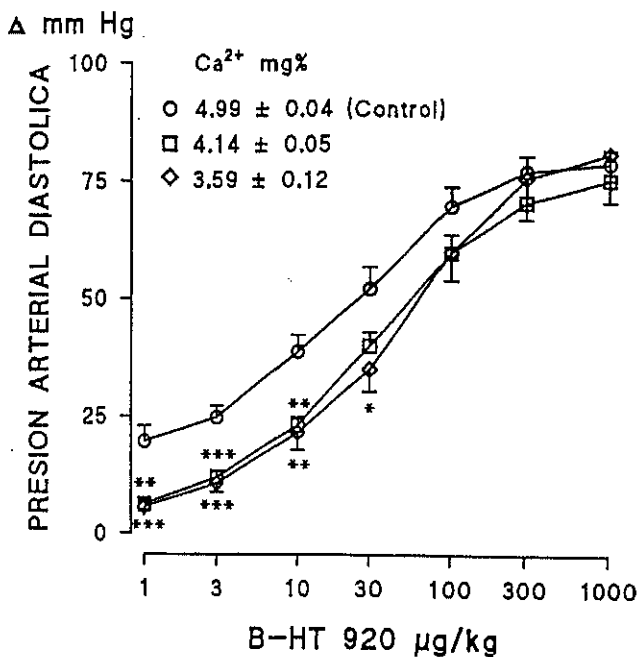


FIGURA 26.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por B-HT 920 en ratas control y ratas con dos niveles de hipocalcemia, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

4.3.2. RATAS CON HIPERCALCEMIA AGUDA

Después de ocasionar una elevación aguda de la calcemia los incrementos presores producidos por agonistas α en la preparación de "pithed-rat" fueron menores. La diferencia con los incrementos presores en ratas control fué más acentuada cuando el grado de hipercalcemia era mayor.

Cuando la concentración de calcio iónico en plasma era 7.56 ± 0.19 mg%, los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina fueron menores que los incrementos en ratas control, presentando los incrementos presores producidos por las dosis del fármaco iguales o mayores de $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ diferencias significativas.

Cuando la concentración de calcio iónico en plasma era 12.1 ± 0.44 mg%, el incremento de la PAS y de la PAD producido por metoxamina fué aún menor, existiendo en este caso diferencia significativa con el incremento presor de todas las dosis del fármaco en ratas control. Ver tablas XIX y XX (pag 112 y 114), y figuras 27 y 28 (pag 113 y 115).

TABLA XIX

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPERCALCEMIA

METOXAMINA $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPERCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	7.56 \pm 0.19	12.10 \pm 0.44
10	17.00 \pm 1.23	13.20 \pm 2.43	7.56 \pm 0.65***
30	36.83 \pm 2.60	25.71 \pm 4.09*	16.46 \pm 2.22***
100	109.71 \pm 6.57	54.66 \pm 8.22***	38.50 \pm 3.96***
300	158.50 \pm 5.56	91.16 \pm 10.43***	91.88 \pm 6.68***
1000	183.83 \pm 5.17	135.20 \pm 14.44**	127.36 \pm 9.08***
3000	201.66 \pm 3.48	154.00 \pm 9.60***	146.66 \pm 10.91***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

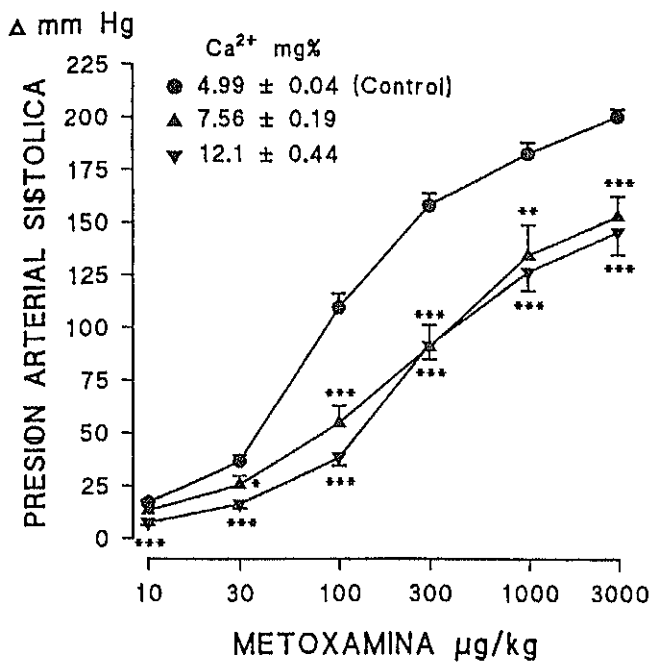


FIGURA 27.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por Metoxamina en ratas control y ratas con dos niveles de hipercalcemia aguda, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TABLA XX

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPERCALCEMIA

METOXAMINA $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPERCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
		7.56 \pm 0.19	12.10 \pm 0.44
10	4.99 \pm 0.04	9.66 \pm 1.80	6.44 \pm 0.73***
30	14.00 \pm 1.03	21.83 \pm 4.02*	13.06 \pm 2.58***
100	32.83 \pm 2.57	44.80 \pm 7.11**	34.22 \pm 3.23***
300	82.71 \pm 5.40	66.14 \pm 7.47***	64.25 \pm 5.28***
1000	109.00 \pm 2.96	79.14 \pm 9.41*	79.88 \pm 3.27***
3000	112.83 \pm 4.02	87.85 \pm 7.26**	81.56 \pm 3.53***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

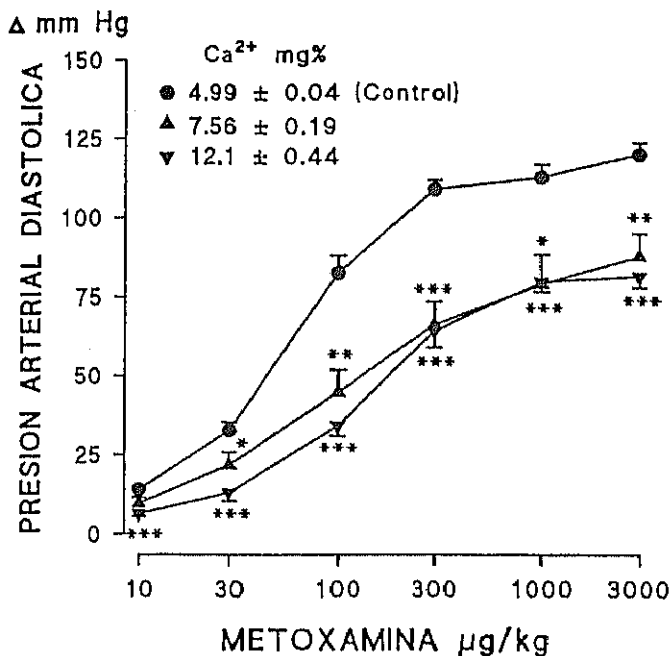


FIGURA 28.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por metoxamina en ratas control y ratas con dos niveles de hipercalcemia aguda, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Las ratas hipercalcémicas mostraron también menor incremento de la PAS y de la PAD cuando se administraba B-HT 920 en la preparación de "pithed-rat", pero en la mayoría de los casos no existió diferencia significativa entre los incrementos en las ratas control y los incrementos en las ratas con un nivel de calcio iónico en plasma de 7.56 ± 0.19 mg%.

Cuando el nivel de calcio iónico en plasma era 12.1 ± 0.44 mg%, la diferencia con el incremento de la PAS en ratas control fué significativa para todas las dosis del fármaco, y la diferencia con el incremento de la PAD en ratas control fué significativa para dosis iguales o mayores de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$. Ver tablas XXI y XXII (pag 117 y 119), y figuras 29 y 30 (pag 118 y 130).

TABLA XXI

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPERCALCEMIA

B-HT 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPERCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	7.56 \pm 0.19	12.10 \pm 0.44
1	21.80 \pm 3.28	11.83 \pm 1.55*	12.96 \pm 2.21*
3	27.88 \pm 2.88	21.16 \pm 2.32	16.64 \pm 1.71*
10	39.10 \pm 1.73	29.83 \pm 2.74*	28.18 \pm 4.46*
30	62.86 \pm 2.54	56.83 \pm 5.36	41.14 \pm 7.28**
100	95.51 \pm 4.86	87.66 \pm 3.81	48.82 \pm 7.49***
300	108.20 \pm 5.07	105.20 \pm 4.49	52.46 \pm 8.10***
1000	111.15 \pm 5.11	113.60 \pm 6.94	52.98 \pm 8.13***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

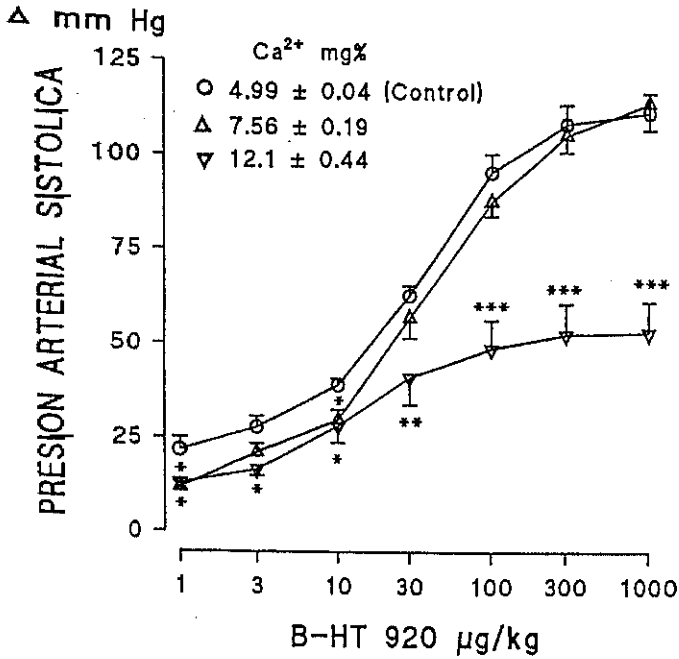


FIGURA 29.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por B-HT 920 en ratas control y ratas con dos niveles de hipercalcemia aguda, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

TABLA XXII

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON DOS NIVELES DE HIPERCALCEMIA

B-HT 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CONTROL ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	HIPERCALCEMIA ($\text{Ca}^{2+}\text{mg}\%$)	
	4.99 \pm 0.04	7.56 \pm 0.19	12.10 \pm 0.44
1	19.73 \pm 3.27	11.66 \pm 2.44	13.74 \pm 3.62
3	24.88 \pm 2.46	19.66 \pm 2.18	18.20 \pm 3.92
10	38.75 \pm 3.51	28.04 \pm 2.35*	23.38 \pm 2.32**
30	52.13 \pm 4.66	44.51 \pm 2.50	33.22 \pm 2.65**
100	69.68 \pm 4.18	61.12 \pm 2.09	42.58 \pm 5.98**
300	77.15 \pm 3.36	71.21 \pm 2.45	47.78 \pm 7.61**
1000	79.01 \pm 2.87	76.83 \pm 4.14	49.08 \pm 8.00**

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

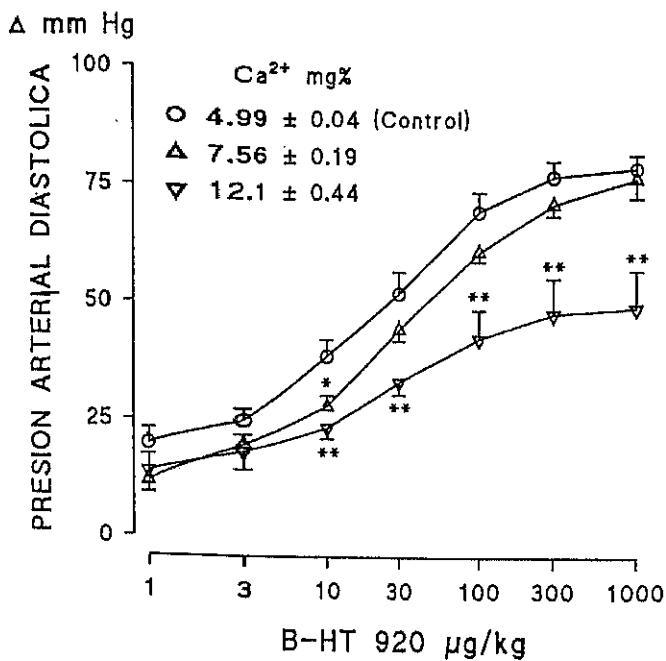


FIGURA 30.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por B-HT 920 en ratas control y ratas con dos niveles de hipercalcemia aguda, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

En los ensayos en los que se administraron los agonistas α tanto en condiciones basales (normocalcemia) como después de elevar la concentración de calcio iónico en plasma hasta un valor de 12.1 ± 0.44 mg% en la misma rata, pudo comprobarse que los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por la dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ de metoxamina, fueron mayores antes de elevar la concentración de calcio iónico en plasma, existiendo diferencia significativa entre los incrementos antes y después de la elevación de la calcemia. La elevación de la PAS producida por la dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ en condiciones basales (normocalcemia) fué de 133.40 ± 4.12 mm Hg ($n = 5$), y la elevación de la PAS producida por la misma dosis después de la elevación de la calcemia fué de 108.8 ± 4.58 mm Hg ($n = 5$), ($p < 0.01$). La elevación de la PAD producida por la dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ en condiciones basales (normocalcemia) fué de 94.60 ± 2.87 mm Hg ($n = 5$), y la elevación de la PAD producida por la misma dosis después de la elevación de la calcemia fué de 80.40 ± 3.02 mm Hg ($n = 5$), ($p < 0.01$). Ver figura 31.

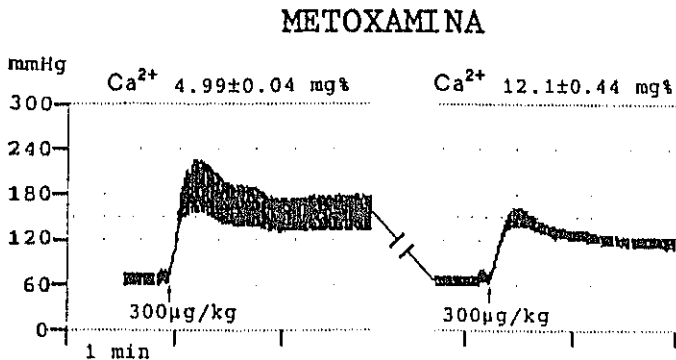


FIGURA 31.- Incremento de presión arterial producido por la dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ de metoxamina en "pithed-rat" en condiciones basales y después de elevar la concentración de calcio iónico en plasma en la misma rata.

Del mismo modo pudo comprobarse que los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B-HT 920 fueron mayores antes de elevar la concentración de calcio iónico en plasma, existiendo también en este caso diferencia significativa entre los incrementos antes y después de la elevación de la calcemia. La elevación de la PAS producida por la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en condiciones basales (normocalcemia) fué de 98.00 ± 3.58 mm Hg ($n = 5$), y la elevación de la PAS producida por la misma dosis después de la elevación de la calcemia fué de 59.00 ± 3.64 mm Hg ($n = 5$), ($p < 0.001$). La elevación de la PAD producida por la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en condiciones basales (normocalcemia) fué de 70.66 ± 3.32 mm Hg ($n = 5$), y la elevación de la PAD producida por la misma dosis después de la elevación de la calcemia fué de 57.00 ± 1.88 mm Hg ($n = 5$), ($p < 0.01$). Ver figura 32.

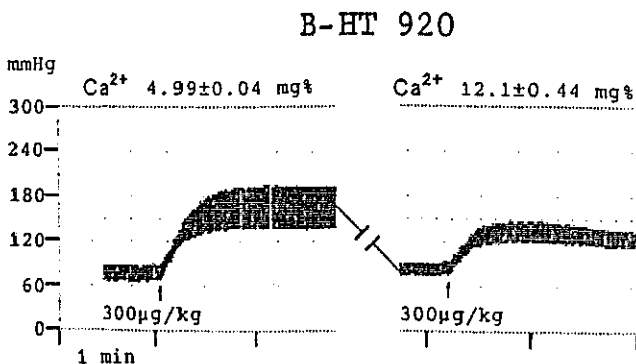


FIGURA 32.- Incremento de presión arterial producido por la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B-HT 920 en "pithed-rat" en condiciones basales y después de elevar la concentración de calcio iónico en plasma en la misma rata.

La administración i.p. de Cl_2Ca en la preparación de "pithed-rat" no modificó la presión arterial basal, y no se observaron durante los 90 minutos siguientes a la administración de 8.8 mg Ca/100 g variaciones superiores a 0.78 mm Hg en la PAS ni variaciones superiores a 0.54 mm Hg en la PAD en la citada preparación, (n = 6).

Sin embargo, en los ensayos en los que previamente se elevó la presión arterial mediante una infusión i.v. de metoxamina (50 $\mu\text{g}/\text{min}$) se apreció un efecto hipotensor producido por la administración i.p. de Cl_2Ca . Como podemos ver en las tablas XXIII y XXIV (pags 124 y 125), y figuras 33, 34 y 35 (pags 126, 127, y 128), la infusión i.v. de metoxamina (50 $\mu\text{g}/\text{min}$) ocasiona una elevación mantenida de la PAS y de la PAD en la preparación de "pithed-rat", y aunque con el tiempo se observa un descenso de la presión arterial, 1 hora después de comenzar la infusión esta aún permanece elevada. Cuando 25 minutos después de comenzar la infusión, se administra Cl_2Ca (8.8 mg Ca/100 g) se observa un descenso brusco de la PAS y de la PAD, volviendo estos parámetros a valores próximos a los basales antes de comenzar la infusión.

TABLA XXIII

INCREMENTO (mm Hg) DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR UNA INFUSION DE METOXAMINA 50 µg/min EN RATAS CONTROL Y EN RATAS EN LAS QUE SE ADMINISTRABA Cl₂Ca i.p. (Ca 8.8 mg/100 g), 25 MINUTOS DESPUES DE COMENZAR LA INFUSION

Tiempo de infusión (min.)

	2.5	5	10	20	30	40	50	60
Metoxamina	92.87±4.88	110.12±6.49	114.25±6.09	115.25±7.23	112.87±7.19	106.50±6.68	102.62±8.11	101.01±7.61
Metoxamina + Cl ₂ Ca	108.40±5.10	118.40±4.15	117.60±2.60	112.80±3.80	66.80±3.59	45.00±4.18	28.80±7.88	18.80±7.74

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

TABLA XXIV

INCREMENTO (mm Hg) DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA EN "PITHED-RAT" PRODUCIDO POR UNA INFUSION DE METOXAMINA 50 μ g/min EN RATAS CONTROL Y EN RATAS EN LAS QUE SE ADMINISTRABA Cl_2Ca i.p. (Ca 8.8 mg/100 g), 25 MINUTOS DESPUES DE COENZAR LA INFUSION

Tiempo de infusión (min.)

	2.5	5	10	20	30	40	50	60
Metoxamina	70.50 \pm 7.10	84.50 \pm 5.94	91.12 \pm 3.36	91.50 \pm 2.45	90.12 \pm 2.79	88.37 \pm 3.79	86.00 \pm 3.98	85.37 \pm 4.20
Metoxamina + Cl_2Ca	76.40 \pm 6.11	86.80 \pm 6.98	91.60 \pm 6.13	86.00 \pm 4.95	63.40 \pm 4.80 ***	45.20 \pm 4.16 ***	29.60 \pm 7.18 ***	19.00 \pm 7.50 ***

Los datos representan la media \pm error standard de la media para 5 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

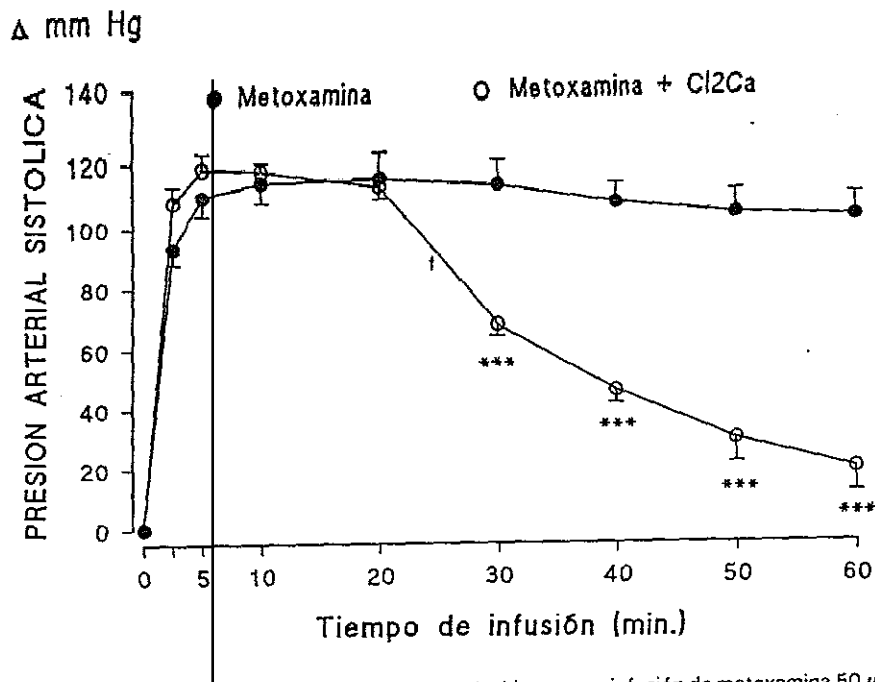


FIGURA 33.- Incremento de presión arterial sistólica en "pithed-rat" producido por una infusión de metoxamina 50 μ g/min, en ratas control y en ratas en las que se administraba Cl₂Ca i.p. (Ca 8.8 mg/100 g) 25 minutos después de comenzar la infusión (!)
 Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

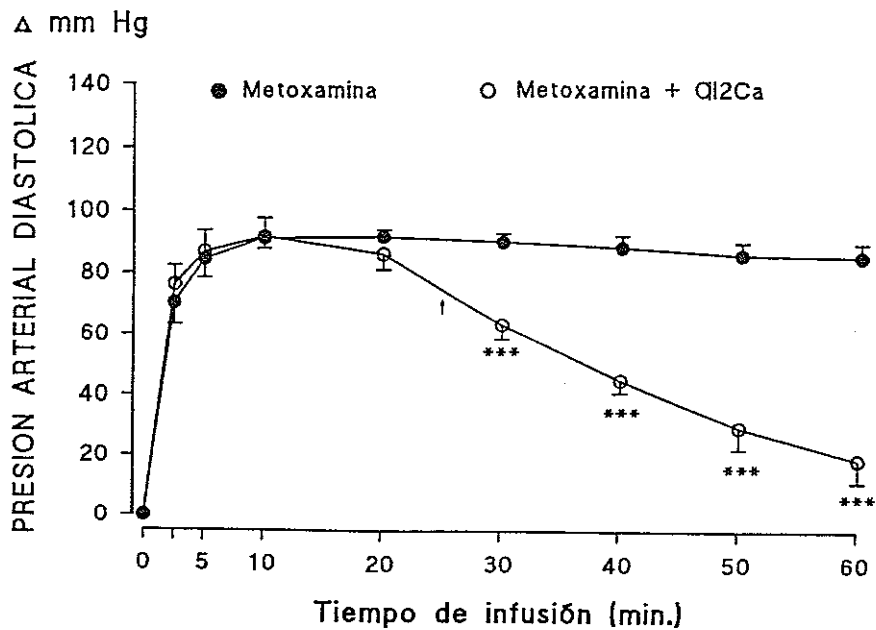


FIGURA 34.- Incremento de presión arterial diastólica en "pithed-rat" producido por una infusión de metoxamina 50 μ g/min, en ratas control y en ratas en las que se administraba Cl₂Ca i.p. (Ca 8.8 mg/100 g) 25 minutos después de comenzar la infusión (!) Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

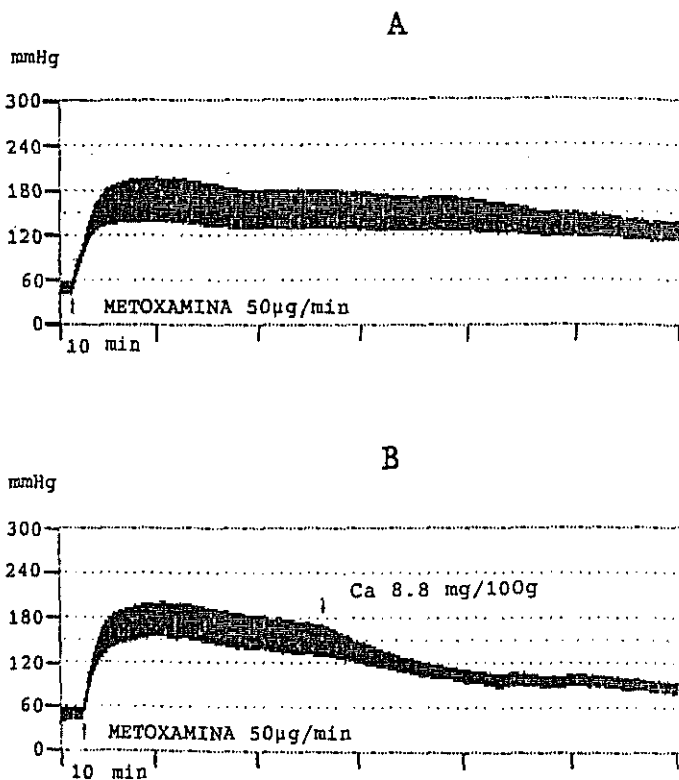


FIGURA 35.- Registros de presión arterial en "pithed-rat" durante la infusión de metoxamina 50 μ g/min en ratas control (A), y en ratas en las que se administraba Cl_2Ca i.p. (Ca 8.8 mg/100 g), 25 minutos después de comenzar la infusión (B).

4.3.3. RATAS CON HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

Los incrementos presores producidos por los agonistas α en la preparación de "pithed-rat" fueron menores cuando las ratas habían mantenido un tratamiento continuado con sales de calcio por vía oral. En este caso los incrementos presores no presentaron una diferencia tan acentuada con los incrementos presores en ratas control, como los incrementos presores producidos por los agonistas α después de una elevación aguda de la calcemia.

Catorce días después de un tratamiento con CO_3Ca en la dieta sólida (4% de calcio elemento) y con Cl_2Ca en la dieta líquida (1.5% de calcio elemento), existió una disminución no significativa de los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina y B-HT 920. Después de mantener 2 meses este tratamiento los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por metoxamina y B-HT 920 fueron aún menores, presentando en este caso diferencia significativa con el control los incrementos de la PAD producidos por 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y por 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de metoxamina, así como los incrementos de la PAS y de la PAD producidos por dosis iguales o menores de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B-HT 920. Ver tablas XXV, XXVI, XXVII, y XXVIII, (pags. 130, 132, 134, y 136), y figuras 36, 37, 38, y 39, (pags. 131, 133, 135, y 137).

TABLA XXV

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

METOXAMINA µg/kg	DURACION DEL TRATAMIENTO (1)		
	CONTROL	14 días	2 meses
10	17.00 ± 1.23	17.66 ± 1.11	15.20 ± 1.92
30	36.83 ± 2.60	39.83 ± 1.70	27.40 ± 3.37
100	109.71 ± 6.57	88.16 ± 6.74	66.20 ± 7.55
300	158.50 ± 5.56	130.66 ± 5.55	124.60 ± 10.91
1000	183.83 ± 5.17	165.60 ± 4.54	175.10 ± 4.03
3000	201.66 ± 3.48	186.33 ± 7.89	181.20 ± 5.26

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.
No existió significación estadística.

(1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag 70.

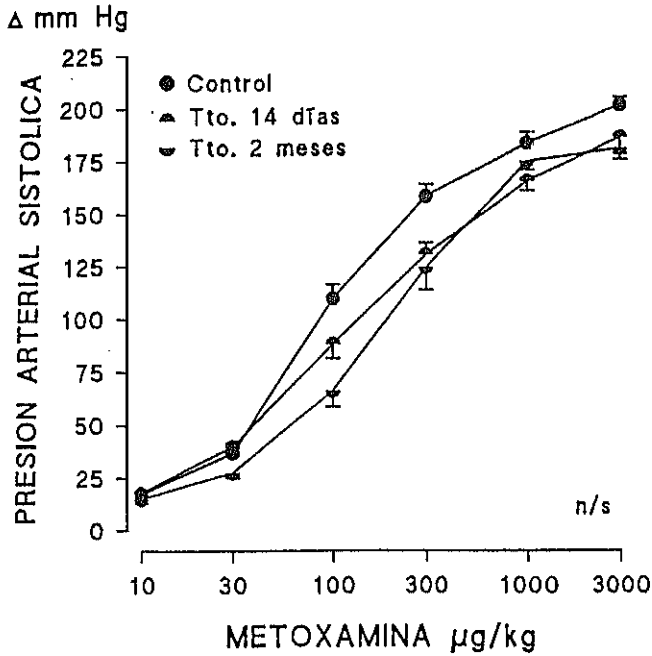


FIGURA 36.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por metoxamina i.v. en ratas control y ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

n/s = No existió significación estadística.

Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag. 70.

TABLA XXVI

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR METOXAMINA EN RATAS CONTROL Y RATAS CON HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

METOXAMINA µg/kg	CONTROL	DURACION DEL TRATAMIENTO (1)	
		14 días	2 meses
10	14.00 ± 1.03	13.16 ± 1.13	11.10 ± 2.09
30	32.83 ± 2.57	32.66 ± 1.33	21.60 ± 2.60*
100	82.71 ± 5.40	66.50 ± 4.58	57.80 ± 6.15*
300	109.00 ± 2.96	99.40 ± 2.99*	99.40 ± 7.20
1000	112.83 ± 4.02	113.40 ± 3.05	109.60 ± 5.51
3000	120.16 ± 3.68	108.83 ± 5.19	115.60 ± 4.29

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

(1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag 70.

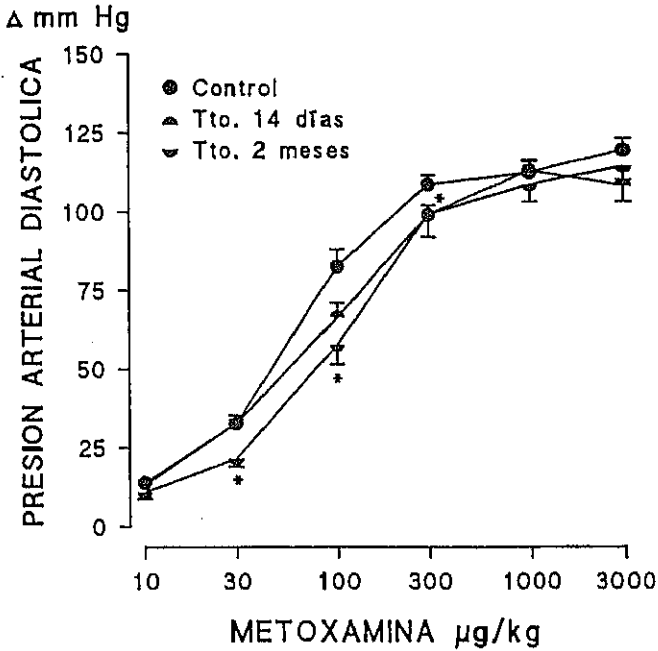


FIGURA 37.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por metoxamina i.v. en ratas control y ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-7 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag 70.

TABLA IXVII

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

B-HT 920 µg/kg	CONTROL	DURACION DEL TRATAMIENTO (1)	
		14 días	2 meses
1	21.80 ± 3.28	25.61 ± 2.74	6.20 ± 1.77**
3	27.88 ± 2.88	31.23 ± 3.44	10.41 ± 1.96**
10	39.10 ± 1.73	44.03 ± 2.93	22.45 ± 3.18*
30	62.86 ± 2.54	76.21 ± 6.24	41.62 ± 5.62*
100	95.51 ± 4.86	94.45 ± 2.63	68.43 ± 8.34
300	108.20 ± 5.07	98.82 ± 3.92	88.20 ± 7.11
1000	111.15 ± 5.11	102.28 ± 3.24	95.24 ± 9.99

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

(1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag 70.

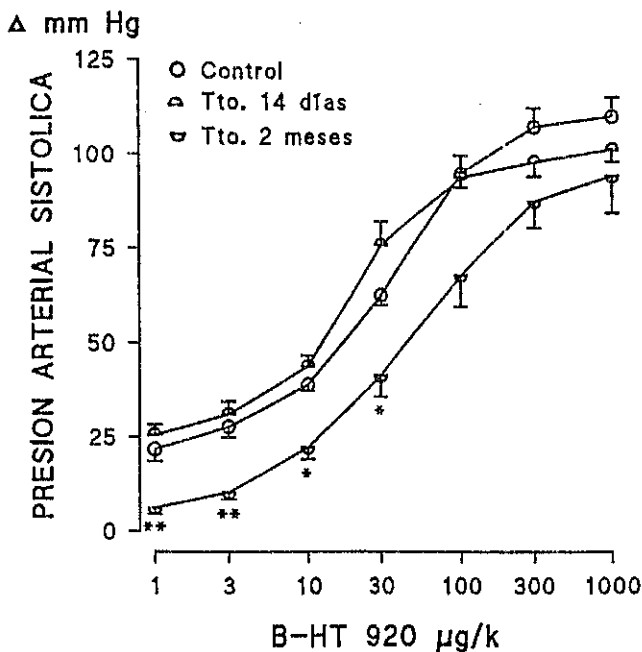


FIGURA 38.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial sistólica producido por B-HT 920 i.v. en ratas control y ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag. 70.

TABLA XIVIII

INCREMENTO DE PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mm Hg) PRODUCIDO POR B-HT 920 EN "PITHED-RAT" EN RATAS CONTROL Y RATAS CON HIPERCALCEMIA SUBCRONICA Y CRONICA

B-HT 920 µg/kg	CONTROL	DURACION DEL TRATAMIENTO (1)	
		14 días	2 meses
1	19.73 ± 3.27	20.22 ± 2.24	6.42 ± 1.74*
3	24.88 ± 2.46	26.64 ± 2.61	10.61 ± 1.86**
10	38.75 ± 3.51	39.05 ± 2.34	21.23 ± 2.45*
30	52.13 ± 4.66	56.21 ± 2.80	38.40 ± 3.47*
100	69.68 ± 4.18	67.63 ± 2.92	56.84 ± 4.05
300	77.15 ± 3.36	68.82 ± 2.95	68.81 ± 5.68
1000	79.01 ± 2.87	71.83 ± 2.67	77.83 ± 7.70

Los datos representan la media ± error standard de la media para 5-7 ensayos.

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

(1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag 70.

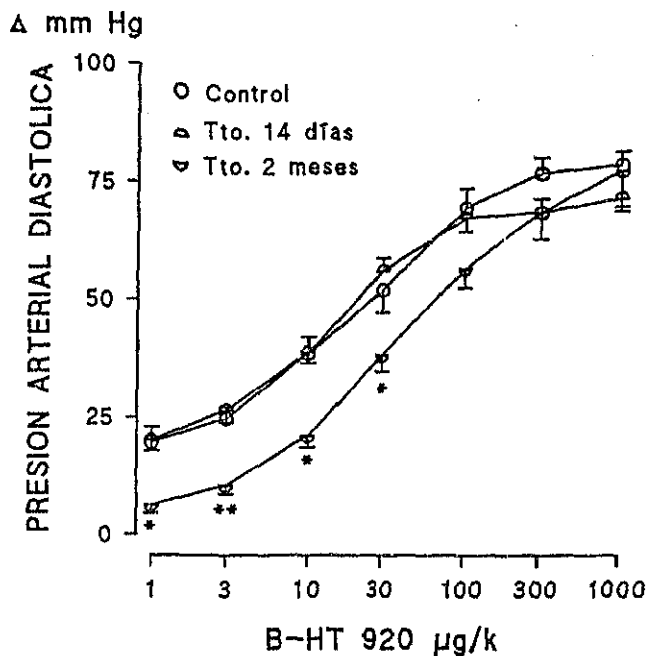


FIGURA 39.- Curvas dosis-respuesta logarítmicas del incremento de presión arterial diastólica producido por B-HT 920 i.v. en ratas control y ratas con hipercalcemia subcrónica y crónica, en "pithed-rat".

Los símbolos representan la media \pm error standard de la media para 5-6 ensayos.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Ver tratamientos en Tabla IV, pag. 66, y cifras de calcemia en Tabla V, pag. 70.

5. DISCUSSION

En esta Tesis Doctoral nos hemos planteado la posible modificación de los efectos vasoconstrictores mediados por estímulo de receptores α vasculares cuando existen alteraciones de los niveles de calcio en plasma. Para ello hemos llevado a cabo un estudio del efecto presor del agonista α_1 selectivo metoxamina, y del agonista α_2 selectivo B-HT 920, en la preparación de "pithed-rat". Esta preparación nos ha permitido estudiar el efecto vasoconstrictor producido por estímulo de receptores α_1 y α_2 vasculares, ya que en ella los incrementos de presión arterial producidos por metoxamina y por B-HT 920 se consiguen después de haber descerebrado y desmedulado a la rata. Los efectos α presores se han estudiado en ratas con hipocalcemia aguda y en ratas con hipercalcemia aguda, pero además se han llevado a cabo ensayos en "pithed-rat" con los agonistas α después de mantener la calcemia elevada durante distintos periodos de tiempo.

Comenzamos nuestro estudio determinando la calcemia normal de las ratas macho Sprague-Dawley, que son las que se utilizaron en él. Estas ratas mostraron un nivel de calcio plasmático de 10.38 ± 0.06 mg%. Este valor entra dentro del rango normal de calcio plasmático en el hombre (8.5-10.5 mg%). El valor normal del calcio iónico en plasma en las ratas macho Sprague-Dawley fué 4.99 ± 0.04 mg%, que lógicamente es también similar al valor de calcio iónico en el hombre (\approx 4.5 mg%). Las alteraciones de este valor serán las que en principio puedan conllevar modificaciones del efecto α vasoconstrictor, ya que es esta fracción del calcio plasmático la única que puede acceder al interior celular para facilitar la contracción del músculo liso arterial.

Hemos conseguido disminuciones agudas de la calcemia en las ratas mediante la administración i.p. de distintas cantidades de CT de salmón, caracterizada por su elevada actividad hipocalcemiante. Asimismo hemos inducido elevaciones agudas de la calcemia en las ratas mediante la administración i.p. de distintas cantidades de Cl_2Ca a los animales. Después de estos tratamientos agudos ha podido establecerse el tiempo que permanece la calcemia alterada en cada caso, y el momento en el que la alteración es máxima. Esto nos permitió programar los ensayos posteriores con los agonistas α en la preparación de "pithed-rat".

Con las administraciones de CT las disminuciones máximas se apreciaban más tarde cuanto mayor era la dosis administrada, y esto deberá considerarse para otros estudios que quieran llevarse a cabo con disminuciones acentuadas de la calcemia.

Para nuestros ensayos en hipocalcemia hemos seleccionado la administración de 1 U.I. de CT, llevando a cabo ensayos 3 horas después con los agonistas α . Esto supone que los ensayos se realizaban con un nivel de calcio iónico de 4.14 ± 0.05 mg%, es decir con algo menos de 1 mg% de calcio iónico que en los ensayos control. Hemos estudiado

también las respuestas de los agonistas α en "pithed-rat" con un nivel de calcemia aún más bajo. Para ello seleccionamos la administración de 4 U.I. de CT, y en este caso los ensayos con los agonistas α se iniciaron 5 horas después de la inyección. En estos ensayos las ratas tenían un calcio iónico de 3.59 ± 0.12 mg%, es decir tenían aproximadamente 1.5 mg% menos de calcio iónico que las ratas de los ensayos control. Con ambos niveles de hipocalcemia pudimos apreciar alteración de los efectos producidos por los agonistas α , y aunque entre los dos grupos de ratas hipocalcémicas existe solo una diferencia de 0.55 mg% de calcio iónico, esta diferencia acentuó las alteraciones en las respuestas presoras de metoxamina y B-HT 920 en "pithed-rat".

La vasoconstricción producida por los agonistas α en "pithed-rat" fué menor en ratas hipocalcémicas. Esto desde luego no es extraño, y ya señalamos en nuestra hipótesis de trabajo que una hipocalcemia acentuada podría implicar menores niveles intracelulares de calcio útiles para el proceso contráctil en el músculo liso. Es decir, que una disminución del calcio extracelular puede conllevar una menor entrada de calcio al interior de la célula. Como se indicó en el apartado de Antecedentes, Hipótesis, y Objetivos, ya habíamos comprobado anteriormente, que la inhibición de la entrada de calcio al interior de la célula del músculo liso arterial mediante la utilización de antagonistas del calcio, inhibía marcadamente la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_2 vasculares, resultando menos sensible la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_1 vasculares. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral cuando disminuye la calcemia, señalan variaciones importantes en la vasoconstricción producida por las dosis más bajas del agonista α_2 B-HT 920, con menores incrementos de la PAS y de la PAD en la preparación de "pithed-rat" para los dos niveles de hipocalcemia estudiados (pags 106-110). Hay que tener en cuenta que después de la administración de agonistas α_2 en la preparación de "pithed-rat", tiene lugar una elevación de la presión arterial menos brusca que con la administración de los agonistas α_1 , y existe siempre una demora en la recuperación de los niveles basales previos de presión arterial. Cuando se administran dosis muy altas de un agonista α_2 ni siquiera se consigue la recuperación total en un plazo razonable de tiempo, y las dosis se administran de forma acumulativa. Por ello la evaluación de las respuestas presoras con las dosis altas del agonista α_2 B-HT 920 fué siempre más errónea, y esto probablemente justifique que con ellas no se hayan obtenido diferencias significativas en la hipocalcemia. Nuestros resultados actuales señalan también variaciones importantes en la vasoconstricción producida por el agonista α_1 metoxamina, sobretodo cuando la hipocalcemia es más acentuada (calcio iónico = 3.59 ± 0.12 mg%) (pags. 102-105).

Las diferencias en la utilización del calcio para la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_1 y α_2 vasculares, sirvieron en su momento para explicar las respuestas de agonistas selectivos α_1 y α_2 después de un tratamiento con antagonistas del calcio en la preparación de "pithed-rat". Estas diferencias pueden también ayudarnos a explicar los resultados obtenidos con metoxamina y B-HT 920 cuando disminuye la calcemia. El calcio extracelular es fundamental para la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_2 , pero es también útil para la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_1 . En este último caso la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares es sin embargo una fuente importante de aporte. Los depósitos intracelulares podrían compensar las necesidades de calcio cuando se produzca vasoconstricción por estímulo de receptores α_1 si la hipocalcemia no es muy acentuada. No obstante, con la disminución menor de calcio iónico en plasma, pudo ya apreciarse una disminución de los efectos vasopresores por estímulo de receptores α_1 , y esto señala que el calcio extracelular puede ser también importante para la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α_1 vasculares.

Después de la administración i.p. de Cl_2Ca a las ratas tiene lugar casi inmediatamente después una alteración importante de la calcemia. En este caso el aumento de la calcemia es siempre máximo 30 minutos después de las distintas administraciones, por lo que los estudios que requieran elevaciones máximas de la calcemia deberán llevarse a cabo 30 minutos después de administrar Cl_2Ca a las ratas. Gittes et al. señalaron también hace tiempo que cuando se administraba i.p. Cl_2Ca (3.3 ó 4.4 mg Ca/100 g) a ratas macho Holtzman, la elevación máxima de la calcemia se alcanzaba aproximadamente 30 minutos después de la administración, manteniéndose la situación de hipercalcemia más de 2 horas. Por este motivo estos autores para mantener la hipercalcemia durante varias horas repetían las administraciones i.p. de Cl_2Ca a intervalos de 2 horas (Gittes et al. 1968).

En nuestro estudio después de la administración de cantidades iguales o inferiores a 8.8 mg Ca/100 g, las ratas mostraban un comportamiento normal, sin signos aparentes de toxicidad. Estas administraciones de Cl_2Ca podrían ser útiles en principio para estudios farmacológicos en la hipercalcemia. Hay no obstante que señalar que cuando se llevaban a cabo las determinaciones analíticas estos tratamientos ya ocasionaban un descenso en las proteínas totales (ver tabla IX, pag 83), y además el volumen de sangre recogido cuando se sacrificaban las ratas era menor (ver tabla X, pag 85). Pensamos que la administración i.p. de calcio a las ratas probablemente origina un fenómeno de coagulación intravascular, y existiría un consumo de factores proteicos implicados en este fenómeno.

La administración de cantidades iguales o mayores de 13.2 mg Ca/100 g, que acentuó las alteraciones mencionadas, y que ocasionó aparición de comportamientos anómalos, pensamos que sería únicamente apropiada para ensayos propiamente toxicológicos. La administración de heparina justo antes de la inyección de Cl_2Ca probablemente evita el proceso de coagulación intravascular, y permitió que en las ratas tratadas con mayor cantidad de Cl_2Ca se recogiese sangre suficiente para las determinaciones analíticas.

En nuestro estudio hemos seleccionado la administración i.p. de 2.2 mg Ca/100 g en forma de Cl_2Ca para llevar a cabo estudios con agonistas α en "pithed-rat", presentando en este caso las ratas un calcio iónico próximo a 7.56 ± 0.19 mg% en el momento de realizar los ensayos. Este nivel de calcio iónico sería el que presentarían las ratas justo 30 minutos después de la administración de Cl_2Ca , y hay que tener en cuenta que las curvas dosis-respuestas con los agonistas α comenzaban 15 minutos después de la inyección, y los ensayos duraban aproximadamente 30 minutos. La elevación del calcio iónico de estos ensayos supone un valor de calcio plasmático de 14.71 ± 0.30 mg%, valor que entra dentro del rango de calcemia de muchas de las hipercalcemias que aparecen en clínica. Además de estudiar el efecto de los agonistas α con esta elevación de la calcemia, hemos realizado también ensayos con metoxamina y B-HT 920 en "pithed-rat" 15 minutos después de inyectar a las ratas 8.8 mg Ca/100 g en forma de Cl_2Ca , presentando los animales en este caso en el momento de realizar los ensayos, un valor de calcio iónico próximo a 12.1 ± 0.44 mg%. Este último valor de calcio iónico corresponde a un calcio plasmático de 22.57 ± 0.70 mg%, y representa una elevación importante de la calcemia, que solo en condiciones extremas podría alcanzarse en las situaciones patológicas que usualmente se acompañan de hipercalcemia en la clínica. No obstante, estos ensayos con una hipercalcemia muy acentuada nos han servido para establecer si la alteración del efecto α es aún mayor cuanto más alejada esté la calcemia del valor normal.

La vasoconstricción producida por los agonistas α en la preparación de "pithed-rat" fué también menor en ratas hipercalcémicas. En estas ratas parecía desde luego difícil prever los cambios en las respuestas vasculares. El aumento de calcio extracelular por sí mismo ocasiona probablemente un aumento mínimo de la entrada de calcio a las células, y como ya comentamos en el apartado de Antecedentes, Hipótesis, y Objetivos, para que exista un incremento importante en el nivel de calcio dentro de las células vasculares cuando aumenta la calcemia, probablemente sería necesario un estímulo o activación de su entrada. Esta activación en realidad parece fundamental, ya que los niveles fisiológicos de calcio extracelular son siempre muy superiores a los niveles intracelulares. Así por ejemplo, la activación de la entrada de calcio en las células del músculo liso vascular con

el agonista del calcio BAY K 8644, permitió conseguir en nuestro laboratorio mayor vasoconstricción por estímulo de receptores α vasculares incluso en ratas normocalcémicas (Puerdo et al. 1990). Cuando trabajábamos con ratas hipercalcémicas en esta Tesis Doctoral no se utilizaba ningún activador de la entrada de calcio al interior celular, y pudimos comprobar que únicamente con la elevación de la calcemia los efectos α vasoconstrictores no solo no aumentaban, sino que disminuían, siendo además la disminución mayor al elevar más el nivel de calcio iónico en plasma.

Distintos investigadores han estudiado el efecto hipotensor que conlleva la administración aguda de calcio. Sin embargo, como más adelante comentaremos en esta Discusión, los estudios de alteraciones en la reactividad vascular por administración de calcio, se han llevado a cabo usualmente después de la administración continuada de suplementos de calcio en la dieta de las ratas.

Borowitz et al. comprobaron que la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de Cl_2Ca causaba una disminución de la presión arterial que podía prevenirse con la administración i.c.v. de verapamil (Borowitz et al. 1987). Sutoo et al. pudieron obtener resultados similares con la administración i.c.v. de Cl_2Ca y verapamil, y como ya hemos señalado en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral, postularon que el aumento de iones Ca^{2+} en cerebro sería responsable de las disminuciones de la presión arterial que ocasiona la administración de calcio (Sutoo et al. 1987, 1988). Estos autores comprobaron además que el efecto hipotensor del Cl_2Ca i.c.v. se acompañaba con un aumento de los niveles de catecolaminas centrales, y el inhibidor de la tirosina hidroxilasa, α -metil-tirosina, atenúa en las ratas tratadas con Cl_2Ca al 4% en el agua de bebida el efecto hipotensor del calcio. La α -metil-tirosina no causaba sin embargo aumento de la tensión arterial en ratas control, y para ellos el aumento de las catecolaminas centrales, y más concretamente el incremento de la dopamina en el sistema nervioso central, sería curiosamente responsable de los descensos presores que ocasiona la administración de calcio.

La existencia de algún mecanismo central implicado en el efecto hipotensor del calcio no podría descartarse totalmente, pero si bien es cierto que la administración i.c.v. de dopamina se sabe que disminuye la presión arterial en ratas (Kondo et al. 1981), la teoría de Sutoo et al. a nuestro juicio podría no justificar totalmente los efectos hipotensores del calcio. Nuestra Hipótesis de trabajo en esta Tesis Doctoral fue que probablemente existiesen mecanismos periféricos con alteración de respuestas α vasculares implicados en el efecto hipotensor del calcio. Desde luego los resultados presentados en ella utilizando ratas descerebradas y desmeduladas, muestran que después de una elevación aguda de la calcemia, el incremento presor de metoxamina y de B-HT 920

es menor. Parece existir por lo tanto un nivel de calcio iónico óptimo para el efecto vasoconstrictor mediado por estímulo de receptores α vasculares. Este nivel vendría dado por la calcemia fisiológica, que permitiría que los mecanismos de regulación del tono arterial pudiesen siempre entrar en juego, produciéndose la contracción del músculo liso vascular en condiciones óptimas para su adaptación a los requerimientos en cada momento. Los resultados de esta Tesis Doctoral mostraron que a medida que el calcio en plasma se alejaba más del nivel fisiológico, la vasoconstricción producida por estímulo de receptores α se alteraba más. Especialmente en el caso del agonista α_2 B-HT 920 hubo una diferencia considerable entre las respuestas presoras obtenidas en ratas hipercalcémicas cuando trabajábamos con un nivel de calcio iónico de 7.56 ± 0.19 mg%, y las respuestas obtenidas en ratas hipercalcémicas cuando trabajábamos con un calcio iónico de 12.1 ± 0.44 mg% (pags. 116-120). El aumento del calcio extracelular necesario para producir una alteración de las respuestas vasoconstrictoras es menor para metoxamina que para B-HT 920 (pags. 111-115). Esto pudiera deberse a que este último agonista es un agonista α_2 que como bien sabemos tiene mayores requerimientos de calcio extracelular que el agonista α_1 . Los ensayos en los que se administró una dosis única de agonista α (metoxamina o B-HT 920), antes y después de administrar i.p. Cl_2Ca a la rata descerebrada y desmedulada, mostraron también una clara disminución del efecto α vasoconstrictor después de elevar la calcemia, y confirman que este aumento del calcio por encima de los niveles fisiológicos promueve una disminución de la reactividad α vascular, (pags. 121-122).

En las ratas descerebradas y desmeduladas la administración i.p. de Cl_2Ca no ocasionó ninguna alteración aparente de la presión arterial. Esto no es extraño si consideramos que estas ratas por estar descerebradas y desmeduladas tenían ya presiones muy bajas (PAS 60-40 mm Hg, y PAD 50-40 mm Hg). Sin embargo, los resultados en las ratas descerebradas y desmeduladas después de haber producido una elevación de la presión arterial mediante una infusión de metoxamina, señalan que la administración de Cl_2Ca tiene efectos hipotensores (pags. 124-128). Queda por tanto fuera de toda duda que el efecto hipotensor del calcio no es dependiente de la función central, y que una elevación de la calcemia se acompaña usualmente de una disminución de la presión arterial que puede conllevar modificación en las respuestas α vasculares.

Si bien con la administración i.p. de Cl_2Ca en esta Tesis Doctoral hemos presentado un método simple para conseguir elevaciones agudas de la calcemia en las ratas, el mantenimiento de niveles altos de calcio en sangre durante periodos prolongados de tiempo en estos animales resultó más complicado, y presentó algunos problemas que a

continuación comentaremos. Establecimos primero el mejor método para inducir hipercalcemia subcrónica comparando las calcemias y el desarrollo de los animales que habían seguido durante 14 días distintos tratamientos con sales de calcio. A continuación, el tratamiento seleccionado para inducir hipercalcemia subcrónica se prolongó hasta completar los 2 meses en un grupo de ratas. A los 2 meses de tratamiento consideramos que estas ratas habían mantenido una situación de hipercalcemia crónica ya que entonces sus niveles de calcio plasmático y calcio iónico aún permanecían elevados. La calcemia después de 2 meses de tratamiento era algo menor que la calcemia después de 14 días de tratamiento, pero de todos modos en ambos casos existía una diferencia con el valor control de igual significación estadística ($p < 0.001$) (ver tabla XIV, pag 100).

La administración de pidolato de calcio en la dieta líquida hasta conseguir en la misma una concentración de 2% de calcio elemento, pareció en principio poco adecuada para inducir hipercalcemias mantenidas, ya que cuando hicimos determinaciones de la calcemia 2 días después de comenzar los distintos tratamientos con sales de calcio, esto no ocasionó un incremento significativo del nivel de calcio iónico en plasma. El resto de los tratamientos con sales de calcio por vía oral producía 2 días después del cambio en la alimentación incrementos estadísticamente significativos ($p < 0.001$) del calcio iónico (ver tabla XI, pag 90). Este hecho sugirió que la administración de calcio por vía oral podía ser un método bueno y cómodo para inducir hipercalcemias mantenidas. La administración de calcio por vía oral ya se utilizó hace tiempo para inducir hipercalcemia en las ratas. Gittes et al. señalan la posibilidad de inducir hipercalcemia aguda mediante la administración oral por sonda de 2 ml/100 g de una solución de lactato cálcico al 8%. Con este método la hipercalcemia podía apreciarse claramente 30 minutos después de la administración, manteniéndose la calcemia entre 11-13 mg% en ratas Holtzman al menos durante 3 horas (Gittes et al. 1968). Garel y Besnard en 1979 también señalan que la administración de calcio por vía oral ocasiona elevaciones importantes de la calcemia en las ratas. Estos autores consiguen elevaciones agudas de la calcemia de 4-4.5 mg% en ratas Wistar recién nacidas, media hora después de la administración de 200 mg/kg de Cl_2Ca (Garel y Besnard 1979). Más adelante aludiremos en esta Discusión también a muchos trabajos actuales en los que los suplementos de calcio en la dieta de las ratas han podido asociarse al incremento plasmático del calcio de estos animales.

Aunque la vía oral resultaba adecuada para inducir hipercalcemia en ratas, y resultaba sobretodo cómoda para inducir hipercalcemia mantenida en estos animales, hay que señalar que en nuestro estudio las ratas mostraron tendencia a rechazar la alimentación enriquecida en calcio cuando esta se prolongaba, siendo menor el consumo

y el desarrollo de las ratas especialmente con las dietas de mayor contenido en calcio (para ver consumos de dietas ver tabla XIII, pag 97, y figura 22, pag 98; y para ver desarrollo ponderal de los animales ver tabla XII, pag 93, y figuras 19, 20, y 21, pags. 94, 95, y 96). Este hecho probablemente contribuye a que después de la elevación inicial, exista usualmente en el curso de los tratamientos una vuelta de la calcemia hacia valores más próximos a los normales. Así pudimos comprobar que 14 días después de comenzar la alimentación con las diferentes dietas enriquecidas en calcio, los niveles de calcio total y calcio iónico en plasma fueron menores que los obtenidos cuando solo habían transcurrido 2 días de tratamiento, si bien en ningún caso existió una recuperación de la normocalcemia en este período de tiempo. Únicamente en el grupo experimental tratado con pidolato de calcio, en el que la concentración era del 1.5% de Ca elemento en la dieta líquida, se obtuvieron mayores cifras de hipercalcemia 14 días después de iniciado el tratamiento. Hay no obstante que tener en cuenta que con este método de aporte de calcio la calcemia había aumentado muy poco a los 2 días de comenzar el tratamiento.

El rechazo mayor de las dietas más enriquecidas en calcio podría también justificar que hallamos encontrado 14 días después de comenzar los tratamientos mayores niveles de calcio total y calcio iónico en plasma con dietas menos ricas en calcio.

Resulta por otra parte curioso el hecho de que los animales que consumían una dieta sólida enriquecida en calcio bebían una cantidad normal de agua, pero cuando aumentábamos el contenido de calcio en la dieta líquida, y sustituíamos el agua de bebida por una solución de Cl_2Ca , o de pidolato de calcio, el aumento de calcio en la bebida de los animales producía en ellos una disminución tanto del consumo de la dieta líquida enriquecida en calcio, como del consumo de la dieta sólida normal.

Como ya señalamos en los Resultados, las ratas tratadas con pidolato de calcio mostraban un deterioro muy acusado de su desarrollo, y las que recibían mayor cantidad morían antes de haber transcurrido 14 días desde el comienzo del tratamiento. Descartamos totalmente el método de aporte de calcio en forma de pidolato de calcio para inducir hipercalcemia mantenida en ratas, ya que cantidades de calcio elemento de este compuesto similares a las que administramos en forma de Cl_2Ca resultaron mucho peores para el desarrollo de los animales que este último. La información facilitada sobre el pidolato de calcio por los Laboratorios B.O.I., S.A. señala que este compuesto no muestra toxicidad aguda en ratas cuando se administra en dosis de 6-10 g/kg. También señala que no resulta tóxico cuando se administra de forma crónica a estos animales utilizándose dosis de 1 g/kg/día, pues después de 100 días de tratamiento con estas dosis no apareció ninguna perturbación del crecimiento o del comportamiento en las ratas, ni se observaron

con su examen macroscópico y microscópico anomalías o lesiones en las principales vísceras (estómago, intestino, pulmones, riñones, testículos, vesículas seminales, y ovarios). En nuestro estudio hay que tener en cuenta que el objetivo final de la administración de pidolato de calcio era inducir y mantener una elevación de la calcemia que en sí misma supusiese una anomalía fisiológica; por ello las dosis utilizadas han sido bastante más altas. Teniendo en cuenta el consumo de la dieta líquida con un 1.5% de calcio elemento en las ratas que bebían solución de pidolato de calcio (6.88 ml/rata/día), y considerando el peso medio aproximado de estas ratas durante el tratamiento (140 g), la dosis de pidolato de calcio ($P_m = 296.29$) ingerida por estas ratas puede estimarse en 5.4 g/kg/día. En las ratas que bebían solución de pidolato de calcio alcanzándose una concentración del 2% de calcio elemento, existió un rechazo total a la ingesta sólida y líquida (ver tabla XIII, pag 97), y ni siquiera procedería estimar la dosis ingerida de pidolato de calcio. Es decir que en cualquier caso el pidolato de calcio en la formulación de Ibercal[®] no parece idóneo para inducir hipercalcemia mantenida en las ratas.

En lo que respecta a la Vit D₃, su administración en una dosis i.m. única de 100000 U.I. al comenzar los tratamientos con dietas sólidas enriquecidas en calcio, produjo mayores aumentos de calcio plasmático en los animales. Esto probablemente se debe a una mejora en la absorción del calcio. Sin embargo, la administración de Vit D₃ no parece esencial para conseguir hipercalcemia mantenida, ya que únicamente apreciábamos hipercalcemias más acentuadas en las determinaciones que se hicieron a los 2 días de tratamiento. Así pues, únicamente se recomendaría esta administración de Vit D₃ para obtener un aumento rápido y sustancial, pero transitorio, en la calcemia.

Otro hecho que ha podido constatarse en esta Tesis Doctoral es que se consigue una elevación del calcio plasmático en las ratas, tanto cuando el calcio se administra con la dieta sólida, como cuando se administra con la dieta líquida. Este hecho pudo constatarse ya hace tiempo con los trabajos de Gittes et al. en 1968, indicando también dichos autores que el aumento era más consistente cuando se aumentaba el calcio en ambos tipos de dieta (Gittes et al. 1968). En este trabajo también se obtuvieron elevaciones de calcio total y calcio iónico en plasma más mantenidas cuando el calcio se administraba conjuntamente con la comida y con la bebida. Las cantidades de calcio administradas por Gittes et al. en la comida (añadiendo CO₃Ca hasta conseguir una concentración del 3% de calcio elemento en la misma), y en la bebida (solución de lactato cálcico al 4%, que corresponde a una concentración de 0.73% de calcio elemento), eran solo ligeramente menores que las que nosotros hemos administrado para el tratamiento conjunto en la comida y en la bebida. Sin embargo, no hemos podido comparar nuestros

resultados de calcemia en los animales con los de estos investigadores, ya que ellos no facilitan datos de niveles de calcemia, y únicamente señalan que un tratamiento de calcio conjunto en la comida y en la bebida puede ser el mejor método de aporte de calcio para conseguir hipercalcemia mantenida.

No hemos encontrado estudios concretos que comparen métodos de aporte de calcio para conseguir modelos experimentales de ratas con hipercalcemia crónica. El tratamiento seleccionado para nuestro estudio fué en realidad un tratamiento conjunto en el que se utilizaban los métodos de aporte de calcio en la comida y en la bebida que menos deterioraban el desarrollo de los animales. Con el método seleccionado conseguimos valores de calcemia 14 días después de comenzar el tratamiento similares a los obtenidos solo 2 días después de comenzar el tratamiento. Si bien el mantenimiento de la calcemia elevada durante 14 días no parece suficiente para estudios de hipercalcemia crónica, esto permitió seleccionar un método de aporte de calcio óptimo para mantener la calcemia elevada durante periodos más prolongados de tiempo. Este tratamiento que conlleva administración de calcio por vía oral en la dieta sólida y en la dieta líquida, produce de todos modos en los animales mayores pérdidas de peso y retraso en el desarrollo que otros de los tratamientos ensayados con aporte de calcio únicamente en la dieta sólida, o únicamente en la dieta líquida. Así pues, aunque el método seleccionado en nuestro estudio es probablemente el más adecuado para mantener la calcemia elevada durante periodos prolongados de tiempo, en otros estudios pudiera ser preferible que los animales consumiesen mejor las dietas, y tuviesen un desarrollo mejor. Lo que en todo caso es cierto es que el CO_3Ca es una sal de calcio que permite una mezcla homogénea del calcio con el resto de los nutrientes de la dieta sólida administrada en forma de harina, y por otra parte el Cl_2Ca por su buena solubilidad, permite administrar comodamente en la bebida de las ratas cantidades de calcio útiles para inducir hipercalcemia en estos animales. Estas sales de calcio son desde luego las que se utilizan en la mayoría de los trabajos actuales que luego referiremos cuando se incrementa el calcio en las dietas de las ratas.

Como referencia final al estudio que hemos llevado a cabo sobre métodos de inducción de hipercalcemia crónica, presentamos a continuación en la tabla XXIX, (pag 150), un método intuitivo para comparar los niveles de calcemia, el consumo, y el desarrollo de las ratas 14 días después de comenzar los diferentes tratamientos con sales de calcio y Vit D₃. Representamos los incrementos y decrementos de estas variables con flechas. Hemos obtenido el intervalo entre el valor control y el valor más alejado del control en cada caso, dividiendo este intervalo entre 4. Hemos utilizado el símbolo igual para valores iguales o menores de ese cociente, el símbolo de una flecha para valores iguales

o menores del doble de ese cociente, el símbolo de dos flechas para valores iguales o menores del triple de ese cociente, y los valores mayores del triple de ese cociente se representan por tres flechas. En el grupo VII tratado con mayor cantidad de pidolato de calcio, en el que las ratas morfan en el curso del tratamiento, no aparece dato de calcemia a los 14 días.

TABLA XXIX

EVOLUCION COMPARADA DE LOS DISTINTOS GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATAS TRATADAS DURANTE 14 DIAS CON DIFERENTES SALES DE CALCIO Y VIT. D., (1) Ver tratamientos en Tabla IV, pag 66).

(1) GRUPOS	Ca ²⁺ 2 DIAS (mg%)	Ca ²⁺ 14 DIAS (mg%)	EVOLUCION PESO (g)	CONSUMO DIETA SOLIDA (g/rata/día)	CONSUMO DIETA LIQUIDA (ml/rata/día)
CONTROL	4.99±0.04	4.99±0.04	243.2±4.73	21.3	30.3
I	↑↑	↑	=	=	=
II	↑↑↑	↑↑	↓	=	=
III	↑↑	↑	↓	↓	=
IV	↑↑↑	↑	↓	↓	=
V	↑	=	↓	↓	=
VI	↑↑↑	↑	=	=	=
VII	=		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
VIII	=	↑	↓↓	↓↓	↓↓↓
IX	↑↑↑	↑↑↑	↓	↓	=

Ver explicación en el texto (pags. 148-149).

Las ratas que mantenían un tratamiento con sales de calcio por vía oral presentaban una importante disminución de la presión arterial. Pudimos ver en el apartado de Resultados (pag. 100), que esta disminución de la presión arterial podía apreciarse cuando solo habían transcurrido 2 días de tratamiento. Los valores de PAS y PAD permanecían por debajo de los valores basales mientras continuaba el tratamiento con sales de calcio. Como ya señalamos en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral se sabe desde hace tiempo que la ingesta de calcio está correlacionada de forma inversa con los valores de presión arterial. Más recientemente ha podido también comprobarse que los suplementos de calcio en la dieta humana pueden ejercer un importante control de la hipertensión, y por el contrario las deficiencias de calcio en la dieta pueden ocasionar un incremento de la presión arterial, y pueden potenciar el efecto presor de las dietas ricas en sodio (Oliván Martínez et al. 1989; McCauley et al. 1990; Hung et al. 1990; Luft 1990; Iso et al. 1991; Karppanen 1991; Kesteloot 1991; Kolomiets 1991; Kotchen et al. 1991; Sowers 1991). Para McCarron et al. existiría incluso un umbral de consumo de calcio en el hombre, que podría estimarse en 700-800 mg/día, por debajo del cual aumenta el riesgo de hipertensión. Este umbral podría sin embargo modificarse por distintos factores dietéticos, genéticos, y de forma de vida (McCarron et al. 1991). Se ha señalado incluso que existe un pequeño efecto hipotensor asociado al consumo de leche, que podría atribuirse a su contenido en calcio y minerales esenciales (Van Beresteijn et al. 1990). La ingesta de calcio incluso parece capaz de atenuar la hipertrofia ventricular izquierda asociada a situaciones de hipertensión (Zemel et al. 1990). Por otra parte, los suplementos de calcio pueden prevenir la hipertensión y las complicaciones que a ella se asocian en mujeres embarazadas, cuando se administran a partir de la 20 semana de embarazo (Bellizan et al. 1991); y los niveles bajos de calcio pueden servir como diagnóstico de preeclampsia en mujeres embarazadas (Hassan et al. 1991). Además el aumento de calcio en la dieta prenatal se ha comprobado que disminuye la presión arterial en los niños nacidos de estas madres, (McGarvey et al. 1991). Resulta además paradójico que los tratamientos conjuntos con calcio y antagonistas del calcio, sean capaces de controlar la presión arterial en pacientes hipertensos mejor que los tratamientos en los que únicamente se utilizan estos fármacos (Singh et al. 1990).

No obstante, hay que tener en cuenta que usualmente el calcio muestra sus efectos hipotensores sobre todo cuando ya existe una elevación previa de la presión arterial. Algunos trabajos incluso señalan que el calcio de la dieta no juega ningún papel en la regulación de la presión arterial de sujetos normotensos (Orwoll y Oviatt, 1990). Resulta por ello sorprendente que en ratas Sprague-Dawley normotensas se consigan

disminuciones tan acentuadas como las obtenidas en nuestro estudio. Aunque para algunos autores la presión arterial en ratas normotensas WKY puede modularse por el contenido de calcio en la dieta (Itokawa et al. 1974, McCarron 1982), los estudios más actuales señalan que el consumo de calcio modularía únicamente la presión arterial en ratas SHR, pero no lo haría en ratas WKY (Blakeborough et al. 1990, Jirakulsomchoket 1990). Para Blakeborough et al. las ratas SHR podrían tener menor absorción activa de calcio a nivel intestinal que las ratas WKY, y con los suplementos de calcio en la dieta se podría modificar la actividad de los enzimas que catalizan a nivel intestinal su transporte. Desde luego son también numerosos los trabajos actuales en los que se evalúa la importancia que tiene el contenido de calcio en la dieta para controlar la hipertensión en las ratas, y como veremos a continuación también en la mayoría se utilizan ratas hipertensas para estudiar este efecto.

Lo que sí es cierto es que en las ratas normotensas de nuestro estudio los suplementos de calcio utilizados representaban cifras de calcio mayores que las que usualmente se suministran en otros trabajos. Un dato que queda sin embargo poco definido en los trabajos de otros investigadores es el contenido de calcio del agua de bebida en las ratas control. Aunque en algún trabajo se utiliza agua destilada para que beba este grupo de ratas (Hano et al. 1991), usualmente las ratas control beben agua del grifo, con un contenido en calcio no especificado. En nuestro estudio el aporte de calcio en el agua de bebida para los grupos experimentales era alto, pero hay que tener en cuenta que las ratas control consumían el agua natural de Madrid, que según se señaló en la pag. 63, tiene ya un contenido en calcio del 1%.

Desde luego la cantidad de calcio administrada varía bastante en distintos trabajos, pero en ellos siempre, al igual que en el nuestro, el aumento de calcio en la dieta se correlaciona con cifras de presión arterial menores. Así por ejemplo, Fugito et al. utilizan en las ratas SHR dietas con 3 distintos contenidos en calcio: 0.1% (bajo), 0.6% (normal), y 4% (alto). Estas dietas se mantuvieron entre la 6 y 20 semana de vida de las ratas, y al finalizar este período las ratas con mayor contenido de calcio en la dieta presentaban una disminución en los valores de presión arterial, y las que se alimentaban con dieta pobre en calcio mostraron un incremento de la hipertensión (Fugito et al. 1991a, b). Hermsmeyer et al. en 1990, también ensayaron en las ratas dietas ricas en calcio (2%), y dietas pobres en calcio (0.2%), y las ratas que mantenían una dieta pobre en calcio mostraban aumento de la presión arterial, y menor supervivencia. Estos autores comprobaron además que el antagonista del calcio nimodipina, únicamente era capaz de disminuir la presión arterial en ratas hipertensas cuando la dieta tenía al menos un contenido de calcio normal

(Hermesmeyer et al. 1990).

Aunque no ha podido esclarecerse aún el mecanismo por el cual los suplementos de calcio controlan la presión arterial, los estudios en ratas SHR señalan que el control de la presión arterial por los suplementos de calcio en estas ratas no está correlacionado con una disminución del hematocrito y de la viscosidad sanguínea (Hattori et al. 1991). El calcio parece controlar sobre todo el incremento de la presión arterial sodio dependiente, y aumenta las respuestas natriuréticas en estas ratas (Chang et al. 1990; Oparil et al. 1990, 1991; Jirakulsomchok et al. 1990; Luft 1990; Pernot 1991). En algunos trabajos pudo comprobarse que los suplementos de calcio en la dieta líquida (Cl₂Ca 1.5%) aumentaban la excreción de sodio en las ratas SHR tratadas semanalmente con desoxicorticosterona (25 mg/kg), y prevenían el aumento de la presión arterial que tiene lugar en estas ratas por el citado tratamiento (Porsti et al. 1990a, b, 1991; Wuorela et al. 1990). Los suplementos de calcio revirtieron el aumento en los niveles de sodio, y revirtieron también el aumento en los niveles de péptido natriurético atrial, que se aprecian en las ratas tratadas con desoxicorticosterona, por lo que Porsti et al. deducen que el calcio prevendría el desarrollo de hipertensión a través de una regulación del metabolismo del sodio que implica un efecto natriurético (Porsti et al. 1991).

Los suplementos de calcio evitan el desarrollo de hipertensión por un mecanismo en el que desde luego no estaría implicado el sistema renina-angiotensina (Togari et al. 1989; Mangiarua et al. 1990). En los Antecedentes de esta Tesis Doctoral ya señalamos que la hipertensión producida por dietas pobres en calcio no parece estar relacionada con una alteración del sistema renina-angiotensina, ya que no se afecta con el tratamiento de captopril (Togari et al. 1989). Por otra parte Ando et al. en 1991 comprueban que la dieta con un contenido de calcio de 4.07% es capaz de disminuir la presión arterial de ratas Sprague-Dawley cuando se comienza a administrar a partir de la 7 semana de vida conjuntamente con dieta sódica (Na 3.15%) y angiotensina II. El calcio no fué por el contrario capaz de suprimir la elevación de la presión arterial ocasionada por la administración i.p. continuada de angiotensina II durante 12 días (Ando et al. 1991).

Saito et al. comprueban también que el calcio previene el aumento de la presión arterial en la hipertensión sodio dependiente, mediante un efecto natriurético con disminución de la retención de sodio, y señalan que en el efecto hipotensor del calcio también estaría implicada la normalización de la actividad simpática (Saito et al. 1991). En realidad en los estudios anteriormente citados de Ando et al. (Ando et al. 1991), se comprobó que el calcio era capaz de disminuir la concentración plasmática de catecolaminas (A + NA), y se llegó a la conclusión de que la supresión de la actividad

simpática era responsable del efecto hipotensor del calcio. Hano et al. en 1991 también comprueban que los suplementos de calcio en el agua de bebida (Cl_2Ca 1.2%), muestran una disminución de la presión arterial en las ratas SHR, que se podía asociar a una disminución de los niveles plasmáticos de NA (Hano et al. 1991). Para Oparil et al. también el calcio revertiría la hipertensión sodio dependiente en ratas SHR, y también estos autores vieron que las ratas tenían elevados los niveles plasmáticos de NA, y tenían además menor cantidad de NA almacenada en el hipotálamo cuando mantenían un tratamiento con CINA. La dieta enriquecida en calcio restauraba en ellas los niveles de catecolaminas plasmáticas y aumentaba a su vez su captura en el hipotálamo (Oparil et al. 1990). En 1991 Oparil et al. vuelven a comprobar que el calcio previene el desarrollo de hipertensión cuando se aumenta el CINA en la dieta de las ratas SHR, y también que el calcio previene los aumentos de NA en plasma de estas ratas, así como la disminución de NA en el hipotálamo anterior, y el aumento secundario de receptores α_2 centrales (Oparil et al. 1991).

Vemos que en la hipertensión se han descrito alteraciones importantes en los niveles de catecolaminas, que podrían normalizarse con la administración de calcio. La alteración de la reactividad vascular es otro de los mecanismos que podrían estar implicados en la fisiopatología de la hipertensión, y también la reactividad vascular podría modificarse cuando se incrementa el calcio en la dieta, y aumentan las concentraciones plasmáticas de calcio.

Los datos que existen sobre reactividad vascular en la hipocalcemia son hasta el presente escasos y contradictorios, por lo que resulta difícil compararlos con los obtenidos en nuestro estudio. Como ya indicamos en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral, los trabajos de Stern et al. en 1987 señalan que existe una respuesta mayor a NA y angiotensina II en las ratas SHR después de mantener una dieta rica en calcio (Ca 2.8%). Estos autores no encontraron sin embargo diferencias entre las respuestas de segmentos de la arteria de la cola de las ratas SHR cuando estimulaban transmuralmente el tejido, o cuando administraban NA, antes y después de la dieta con calcio. Por lo tanto, para ellos los efectos hipotensores del calcio podían no asociarse con cambios en la reactividad vascular, o podían incluso asociarse a un aumento de la misma. Esto resulta paradójico si tenemos en cuenta que estos incrementos de calcio en la dieta reducían sustancialmente la presión arterial de las ratas SHR, (Stern et al. 1987). Scrogin et al. en 1991 señalan que el incremento de CINA en la dieta de las ratas SHR produce un aumento de presión arterial, y también aumenta los niveles de A plasmáticos, observándose también una mayor respuesta a NA con la dieta sódica. Los suplementos de calcio redujeron la presión arterial, y también los niveles de A en plasma, pero no modificaron por el contrario la reactividad

vascular (Scrogin et al. 1991). Existen no obstante resultados recientes de otros autores, que señalan que el efecto hipotensor del calcio se asocia a una disminución de la contractilidad vascular. Las alteraciones de la reactividad vascular producidas por el calcio pueden sin embargo no tener lugar de forma similar en todos los territorios vasculares, y pueden por otra parte ser más relevantes en ratas hipertensas que en ratas normotensas. Pernot et al. en 1990 comprueban que las respuestas a NA son mayores en ratas hipertensas, y el tratamiento con calcio previene en ellas el desarrollo de hipertensión, y disminuye las respuestas a NA "in vivo". Sin embargo en la aorta de las ratas hipertensas usualmente se apreciaban menores respuestas a NA, y el tratamiento con calcio aumentó las respuestas en ratas normales (Pernot et al. 1990). Sus resultados "in vitro" son por lo tanto difíciles de justificar. Mangiarua et al. en el mismo año describen que el aumento del calcio en la dieta disminuye por el contrario la respuestas presoras de anillos de aorta de ratas SHR, pero esto no sucede en ratas WKY (Mangiarua et al. 1990). Porsti et al. en 1990 señalan que en anillos de aorta, y en anillos de arteria mesentérica de ratas SHR tratadas semanalmente con desoxicorticosterona (25 mg/kg), existe un aumento de las contracciones por NA, y una disminución de la relajación por nitroprusiato y acetilcolina. Los suplementos de calcio en la dieta líquida (Cl₂Ca 1.5%) solo aumentaban la relajación por nitroprusiato en arteria mesentérica. La aorta, que tiene relativamente más tejido conectivo y menos músculo liso, una vez contraída con NA mostró sin embargo relajaciones similares con el nitroprusiato después del tratamiento con calcio. Cuando se combinaba el tratamiento con desoxicorticosterona y calcio, las contracciones eran similares a las contracciones control, pero aumentaba la relajación por nitroprusiato y acetilcolina en arteria mesentérica. Estos autores también deducen que los suplementos de calcio atenúan el desarrollo de hipertensión, y previenen los aumentos de presión arterial por desoxicorticosterona en ratas SHR, a través de alteraciones en la reactividad vascular (Arvola et al. 1990, Porsti et al. 1990a, b, 1991).

Como hemos podido ver, los estudios sobre reactividad vascular de otros autores se han llevado a cabo usualmente con tratamientos continuos de calcio en ratas hipertensas. No existen sin embargo trabajos sobre cambios en la reactividad vascular después de la administración aguda de calcio, ya que como anteriormente comentamos hasta este momento se pensaba que la hipotensión ocasionada por la administración aguda de calcio estaba mediada por mecanismos centrales. Sin embargo, ya se dijo anteriormente en esta Discusión, que los resultados de este estudio muestran una clara disminución de las respuestas α_1 y α_2 vasculares después de un tratamiento agudo con calcio. Los efectos hipotensores que causa la administración aguda de calcio podrían por lo tanto estar

correlacionados con una disminución de las respuestas vasculares a las aminas biógenas.

Las ratas que mantenían en nuestro estudio un tratamiento subcrónico y crónico con sales de calcio, aunque mostraron menores valores de presión arterial, presentaban solo una ligera disminución de las respuestas a metoxamina y a B-HT 920 en la preparación de "pithed-rat" (pags. 129-137). Es decir, que el tratamiento mantenido con sales de calcio podría también asociarse con un descenso en la reactividad α vascular, pero ésta parece modificarse mucho más en los tratamientos agudos de calcio. Hay que tener en cuenta, que con la administración aguda de calcio las alteraciones de la calcemia eran mayores que las obtenidas después de la administración continuada de calcio por vía oral. Las cifras de calcio iónico en plasma después de la administración aguda de calcio, se alejaban mucho más del nivel fisiológico para la contracción vascular. Así pues, serían sobre todo los niveles plasmáticos de calcio iónico los que controlarían las respuestas α vasculares.

Los resultados más recientes sobre reactividad vascular y tratamiento con calcio siguen siendo contradictorios, pero los niveles de calcio extracelular e intracelular parecen esenciales en todo momento para el control de las respuestas vasculares. Está totalmente establecido que las ratas hipertensas tienen menores niveles de calcio total y calcio iónico en plasma, y en las ratas SHR se han descrito también hace tiempo, concentraciones de calcio libre citosólico mayores que las normales (Bhalla et al. 1978). Más recientemente Druke et al. en 1990, señalan que las ratas SHR tendrían probablemente un defecto en los mecanismos de transporte de calcio (Druke et al 1990). Las alteraciones de las concentraciones intracelulares de calcio libre serían probablemente responsables del aumento en la reactividad vascular que acompaña a la hipertensión. En clínica se ha podido incluso establecer hace tiempo la existencia de individuos hipertensos en los que la alteración básica sería una disminución de la afinidad de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente (De la Sierra et al. 1989). Una anomalía de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente condicionaría una evidente dificultad en la extrusión del exceso de calcio citosólico que sigue a la contracción muscular, determinando por tanto un aumento de la concentración de calcio libre citosólico que, a nivel de la musculatura lisa vascular, sería responsable del aumento de las resistencias vasculares periféricas que caracterizan a la hipertensión esencial. En la hipertensión existiría además un aumento del contenido intracelular de Na^+ por anomalías de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{-K}^+$, y según Blaustein el aumento del Na^+ intracelular consecuente a las anomalías de los sistemas que catalizan su transporte transmembranario, podría suponer una dificultad para la extrusión de calcio por el sistema de cotransporte $\text{Na}^+ \text{-Ca}^+$ (Blaustein 1977). La consecuencia final sería también en este caso el aumento en la concentración intracelular de este último catión. En cualquier caso, las anomalías de los

flujos catiónicos parecen en el momento actual esenciales para explicar la etiopatogenia de la hipertensión esencial, y el aumento del Ca^{2+} citosólico siempre aparece como responsable final del aumento del tono vascular, y de las resistencias periféricas (Coca y De la Sierra 1990).

Son muchas las teorías que se han propuesto para explicar el efecto hipotensor de los suplementos de calcio en la dieta, y se sugirió que las dietas con calcio podían promover un descenso en la reactividad vascular, incluso ejerciendo un efecto estabilizador de la membrana del músculo liso vascular (Bohr y Webb 1984, Furspan et al. 1989). Según McCarron los suplementos de calcio podrían mas bien restaurar los flujos normales de calcio en la membrana celular (McCarron 1985). Hano et al. señalan recientemente que la disminución de la presión arterial producida por los suplementos de calcio en la dieta, se asocia a una disminución de los niveles intracelulares de calcio en las ratas (Hano et al. 1991). También recientemente Ambrozi et al. relacionan los cambios en la reactividad vascular con un cambio en la salida de calcio de las células de músculo liso vascular (Ambrozi et al. 1991). Resulta de todos modos paradójico que un aumento del calcio extracelular induzca una mayor salida del calcio al exterior celular.

Resulta además extraño que en nuestro estudio las ratas normotensas tratadas con sales de calcio por vía oral, aún presentando solo pequeñas alteraciones de las respuestas α vasculares, muestren unas cifras tan bajas de presión arterial. Cabe además resaltar que los valores de presión arterial no se modificaban de una forma totalmente paralela a las alteraciones de la calcemia. Es decir, la calcemia, y más concretamente los valores de calcio iónico, están elevados sobre todo durante los primeros 14 días de tratamiento, y tienden a recuperar cifras más próximas a los controles posteriormente. Por el contrario la presión arterial disminuye bruscamente cuando comienza el tratamiento, pero 14 días después ya muestra una recuperación hacia valores más próximos a la normalidad (tabla XIV, pag 100). Esto nos permite pensar que aunque la variación de los niveles plasmáticos de calcio en último término controle siempre de algún modo la presión arterial, este control podría ejercerse solo en parte por un efecto directo del calcio sobre las células de músculo liso vascular. Las alteraciones de la calcemia cuando existe un aporte continuo de calcio podrían poner en juego algún mecanismo adicional para regular el propio metabolismo del calcio, y estos cambios adicionales podrían ser críticos para facilitar los descensos presores.

Drueke et al. en 1990 proponen que en la patogénesis y mantenimiento de la hipertensión, además de existir alteraciones de la permeabilidad al calcio, y además de estar comprometida la capacidad de las células para expulsar, o secuestrar calcio, podrían

también estar implicadas la hiperfunción de la glándula paratiroidea, y la deficiencia en vitamina D (Drueke et al. 1990). Para Resnick, tanto la PTH, como el metabolito activo de la Vit D₃, 1,25(OH)₂D₃, así como un péptido relacionado genéticamente con la CT, controlarían la presión arterial ejerciendo efectos específicos en órganos diana, y más concretamente en el tejido vascular (Resnick 1990). los pacientes hipertensos con niveles bajos de renina se ha visto recientemente que presentan aumento de PTH, y de 1,25(OH)₂D₃ en plasma, y por el contrario descenso en los niveles plasmáticos de CT (Imaoka et al. 1991). En realidad ya señalamos en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral, que los niveles elevados de PTH se han asociado con elevaciones de la presión arterial. Recientemente también Brickman et al. señalan que los pacientes con hipertensión esencial tienen mayores niveles plasmáticos de PTH, y presentan además mayores concentraciones de calcio citosólico en las plaquetas (Brickman et al. 1990). Brickman et al. en 1991 incluso relacionan los niveles de calcio citosólico en las plaquetas, y los niveles de PTH, con la presión arterial en sujetos normotensos. Cuando estos autores hacen un análisis de regresión múltiple usando la presión arterial como variable dependiente, comprueban que tanto el calcio citosólico en las plaquetas, como la PTH, estaban correlacionados de forma significativa con la presión arterial media de estos sujetos. No pudo sin embargo establecerse una correlación entre el calcio citosólico en las plaquetas, y los niveles de PTH, por lo que estos autores llegan a la conclusión de que los dos parámetros están implicados en la regulación de la presión arterial en sujetos normotensos, pero las influencias de ambos sobre la presión arterial no están interrelacionadas (Brickman et al. 1991). Según Resnick et al. podrían existir dos tipos de hipertensión; una sería la hipertensión sodio dependiente, en la que existiría un exceso de la captura del calcio extracelular por las células; y otra sería la hipertensión renina dependiente en la que existiría una excesiva liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (Resnick et al. 1991).

En el momento actual, existen también otros muchos trabajos en los que se han correlacionado las disminuciones de la presión arterial que ocasionan los suplementos de calcio, con alteraciones en los niveles de PTH. Neuser et al. en 1990 comprobaron incluso que el tratamiento continuado con PTH (300 U.I./día s.c.), atenuaba el aumento de presión arterial en ratas que mostraban tendencia a desarrollar hipertensión. Estos investigadores también estudiaron los efectos de la administración i.v. de PTH, y comprobaron que con estas administraciones se producía una disminución de la presión arterial dosis dependiente (Neuser et al. 1990). Repke y Villar en 1991 proponen que los suplementos de calcio en la gestación podrían controlar la hipertensión asociada a embarazo afectando las

concentraciones plasmáticas de PTH, y estas a su vez modularían los niveles de calcio ionizado a nivel intracelular (Repke y Villar 1991). En las mujeres en las que aparece preeclampsia durante el embarazo se han descrito además aumento de los niveles plasmáticos de PTH, y aumento de las concentraciones intraplaquetarias de calcio (Mochizuki et al. 1991).

Resulta tentador pensar que cuando se produce un incremento de la presión arterial, fuese principalmente la PTH la responsable de facilitar la entrada de calcio en las células del músculo liso arterial. La capacidad de esta hormona para facilitar la entrada de calcio en las células ya se comentó en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral. El aumento de PTH que acontecería después de un descenso en la calcemia, podría entonces justificar los incrementos de la presión arterial cuando disminuye el aporte de calcio en la dieta. En los trabajos de Togari et al., reseñados en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral, la hipertensión producida por privación de calcio en la dieta de las ratas normotensas se acompaña de hipocalcemia, e hiperparatiroidismo nutricional (Togari et al. 1989). Se sabe además, que la paratiroidectomía inhibe en parte el efecto hipotensor de las dietas con calcio en ratas hipertensas (Togari et al. 1989, Pernot 1990). Hagihara et al. comprueban también recientemente que las ratas con dietas deficientes en calcio desarrollan hipocalcemia e hiperparatiroidismo. Estos autores encontraron también un aumento de los niveles de catecolaminas en el plasma de estos animales, pero no encontraron diferencias entre los niveles de catecolaminas en ratas control y ratas paratiroidectomizadas, y llegaron a la conclusión de que la génesis de la hipertensión en las ratas con dieta pobre en calcio es secundaria al hiperparatiroidismo causado por dicha dieta, pudiendo existir alguna relación entre la PTH y los niveles de catecolaminas en la regulación de la presión arterial (Hagihara et al. 1990).

En las ratas tratadas con calcio por vía oral los descensos presoras podrían asimismo, acompañarse de disminución en las concentraciones plasmáticas de PTH. Sin embargo en nuestro estudio los niveles de PTH fueron similares en las ratas tratadas con calcio por vía oral, y en las ratas control (tabla XIV, pag 100). No podemos por ello pensar que las variaciones en los niveles de PTH puedan justificar las disminuciones de presión arterial en las ratas de nuestro estudio.

En el momento actual podemos sin embargo señalar que se ha demostrado la existencia de un factor hipertensivo de origen paratiroideo distinto de la PTH (Lewanczuk y Pang 1990, Pang et al. 1990a, b, Pang et al. 1991). Este factor se ha aislado en el plasma de las ratas SHR, pero no aparece en el plasma de las ratas normotensas. Se le ha denominado factor hipertensivo paratiroideo (FHP), porque produce una elevación lenta de

la presión arterial en ratas normotensas, originando un aumento máximo 4 minutos después de su administración en bolo, y 60-90 minutos después de comenzar su administración en infusión continua. El calcio estaría implicado también en el mecanismo de acción del FHP, ya que el aumento de la presión arterial se asoció además con un aumento en la captura de calcio por la arteria de la cola de las ratas, y ambos aumentos siguieron un curso temporal paralelo. Los antagonistas del calcio parecen además capaces de inhibir los efectos vasculares del FHP. Los estudios experimentales con paratiroidectomía, y con trasplante de glándulas paratiroides, no presentan ninguna duda sobre el origen del FHP. Además las glándulas paratiroides de las ratas SHR en cultivo producen un factor en el medio con las mismas propiedades biológicas que el FHP, que ha podido identificarse también como tal mediante la cromatografía de alta resolución. Estudios histológicos sugieren que el FHP se produce por un tipo de células específicas localizadas en las glándulas paratiroides. Estas células aparecen en las ratas SHR, pero no en las ratas normotensas, y el porcentaje de este nuevo tipo celular se ha correlacionado con los niveles de FHP en plasma, y con el nivel de presión arterial.

Con los estudios de Neuser et al. en 1991, también se ha llegado actualmente a la conclusión de que las glándulas paratiroides están implicadas en la patogénesis de la hipertensión, pero la PTH no sería la responsable principal del control de la presión arterial (Neuser et al. 1991). Esto no es extraño si consideramos que cuando se han estudiado los efectos vasculares directos de la PTH, se han obtenido resultados contradictorios. Esta hormona se ha mostrado capaz de elevar las resistencias periféricas, y la presión arterial en humanos y ratas (Bertheloot y Gairard 1980, Hulter et al 1986), pero cuando se administró en infusión en cantidades suprafisiológicas fué sin embargo capaz de inducir vasodilatación en distintos lechos vasculares (Crass y Pang 1980, McCarron et al. 1984). Desde luego en el momento actual el FHP parece el factor paratiroideo más directamente implicado en el control de la presión arterial, y tanto los estudios en animales, como los estudios en el hombre, señalan que este factor estaría asociado con la hipertensión sodio dependiente. Así Resnick et al. en 1991 proponen que los niveles altos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y de FHP, de forma coordinada producen cambios de los niveles intracelulares de calcio, y estimulan la captura de calcio desde el espacio extracelular, por lo que las alteraciones de estas hormonas podrían ser responsables al menos en parte de la hipertensión sodio dependiente.

Otra de las teorías actuales trata de relacionar el control de la presión arterial por los suplementos de calcio con una regulación en la producción de óxido nítrico (NO) en el endotelio vascular. Furchgott y Zawadzki en 1980 comprobaron que muchos

vasodilatadores ejercían sus efectos en el músculo liso vascular indirectamente, mediante la liberación de un factor relajante en las células endoteliales capaz de aumentar los niveles de GMPc en el músculo liso. Más tarde este factor relajante endotelial se identificó con el NO. El NO se comporta como un potente activador de la guanilato ciclasa, y mediante el aumento que ocasiona en los niveles de GMPc, es capaz de promover la relajación en las células de músculo liso vascular (Palmer et al. 1987). En el momento actual se sabe que el enzima que regula la síntesis endotelial de NO es un enzima calcio dependiente que requiere calmodulina (Meyer et al. 1989, Palmer y Moncada 1989, Bredt y Snyder 1990, Busse y Munsch 1990, Moncada y Palmer 1990, Busse et al. 1991, Forstermann et al. 1991, Lugnier 1991). La calmodulina podría activar enzimas que participasen tanto en mecanismos de activación, como en mecanismos de inhibición de la contracción. Así, podría participar en la activación de la quinasa de la cadena ligera de miosina, pero podría también activar enzimas que regulasen la síntesis de nucleótidos cíclicos como adenilato-ciclasa que sintetiza AMPc. La calmodulina activaría también enzimas responsables de la síntesis de NO en el endotelio, y por tanto participaría también así en el proceso de relajación del músculo liso vascular. Dado que parece existir una relación directa entre calcio y producción de NO, se han llevado a cabo estudios que tratan de correlacionar las alteraciones en los niveles extracelulares de calcio con las variaciones en la producción de NO. Lopez-Jaramillo et al. utilizan una preparación de aorta de conejo que se perfunde intraluminalmente como tejido donador de NO, y el efluente de esta preparación se utiliza para perfundir otros tejidos de aorta torácica de conejo desprovista de endotelio. Estos autores comprueban que las alteraciones de la concentración de calcio en el medio de perfusión, pueden realmente modular la producción de NO en aorta de conejo. La duración del efecto que tiene el calcio en el medio de perfusión sobre la liberación de NO, pudo además comprobarse que aumentaba con una infusión simultánea de L-arginina, que es el sustrato sobre el que actúa la sintetasa liberadora de NO. Por lo tanto, estos autores deducen que los cambios en la concentración extracelular de calcio en un rango próximo al fisiológico, modularían la síntesis de NO por el endotelio vascular, y por consiguiente el tono vascular (Lopez-Jaramillo et al. 1990). Como ya anteriormente señalamos, en los trabajos de Arvola et al. en 1990 en anillos de arteria mesentérica de ratas SHR tratadas con suplementos de calcio, pudo demostrarse un aumento en el efecto relajante del nitroprusiato, y estos autores postularon también que el NO participaba en la disminución de la presión arterial de los suplementos de calcio en las ratas SHR. Más recientemente Lopez-Jaramillo y Felix en 1991 sugieren incluso que en el control de la tensión arterial en mujeres gestantes, puede ser crucial la síntesis de NO en el endotelio vascular, y este

agente sería responsable de mantener la vasodilatación que caracteriza una gestación normal. Los suplementos de calcio en mujeres gestantes podrían prevenir el desarrollo de hipertensión controlando la producción de NO a nivel del endotelio vascular (Lopez-Jaramillo y Felix 1991).

Resulta obvio que se necesitan nuevos estudios para poder conocer el/los mecanismos por los que el nivel extracelular de calcio controla la presión arterial. En esta Tesis Doctoral hemos podido establecer que tanto en la hipocalcemia, como en la hipercalcemia, existe una disminución de las respuestas presoras mediadas por estímulos de receptores α_1 y α_2 vasculares. El descenso en la reactividad α vascular cuando aumenta la calcemia puede justificar al menos parcialmente los efectos hipotensores del calcio. Quizá uno de los principales logros de este estudio haya sido poder comprobar que los efectos hipotensores del calcio no están mediados únicamente por sus acciones centrales. En este estudio hemos puesto además de manifiesto que los suplementos de calcio en la dieta modifican la presión arterial de ratas normotensas. Las alteraciones en las respuestas α presoras no parecen justificar la marcada disminución de la presión arterial conseguida con el tratamiento oral de calcio. El objetivo concreto de nuestro estudio era realmente prever posibles alteraciones de la reactividad α vascular, tanto en una situación de hipercalcemia aguda, como en una situación de hipercalcemia mantenida. Queremos no obstante resaltar que para el estudio en hipercalcemia mantenida fué necesario desarrollar un modelo experimental en el que mediante la administración de suplementos de calcio en la dieta de las ratas, se conseguían ratas que mantenían la calcemia elevada durante un período prolongado de tiempo, y las alteraciones que pudieran acontecer en este caso, no necesariamente tienen que implicar los mismos mecanismos que se ponen en marcha para controlar el tono arterial cuando por una situación patológica sobreviene un aumento de calcio en plasma. Sin embargo, el estudio que se ha llevado a cabo sobre métodos experimentales para inducir hipercalcemia crónica en ratas, puede ser útil en un futuro para distintos estudios farmacológicos, y más concretamente puede ser útil para estudios que permitan llegar a conocer el mecanismo por el cual los suplementos de calcio en la dieta controlan la presión arterial.

6. CONCLUSIONES

1. La administración i.p. de CT produce en las ratas un descenso de la calcemia dosis dependiente, obteniéndose más tarde el descenso máximo cuanto más alta es la cantidad inyectada.
2. El descenso agudo de la calcemia (calcio iónico 4.03 ± 0.17 mg% - 3.59 ± 0.12 mg%), produce una disminución de los efectos presores mediados por estímulo de receptores α vasculares, ocasionando alteraciones de las respuestas mediadas por ambos subtipos de adrenoceptores.
3. La administración i.p. de Cl_2Ca produce en las ratas un aumento de la calcemia, que es máximo aproximadamente 30 minutos después de la administración de cantidades de calcio iguales o mayores de 1.1 mg/100 g. de peso, observándose signos de toxicidad al inyectar cantidades iguales o mayores de 13.2 mg/100 g. de peso.
4. En la disminución de la presión arterial producida por la administración aguda de calcio (calcio iónico 7.56 ± 0.57 mg% - 12.1 ± 0.44 mg%), están implicados mecanismos periféricos de inhibición de las respuestas vasoconstrictoras mediadas por estímulo de receptores α_1 y α_2 postsinápticos vasculares.
5. La administración de sales de calcio por vía oral induce hipercalcemia en ratas, elevándose el nivel de calcio plasmático cuando el calcio se administra con la dieta sólida o con la dieta líquida, y manteniéndose mejor la hipercalcemia cuando el calcio se administra en ambas dietas.
6. El tratamiento continuado con sales de calcio por vía oral reduce la presión arterial de ratas normotensas por un mecanismo aún no esclarecido que no implica modificación de los niveles plasmáticos de PTH.
7. La disminución del efecto presor mediado por estímulo de receptores α vasculares en la hipercalcemia, está más condicionado por el incremento de calcio en sangre, que por el tiempo que permanece la calcemia elevada.

7. BIBLIOGRAFIA

- AHLQUIST R.R. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600.
- ALEXANDRE MA.; PINTADO KING A.; PUERRO M. (1990). Effect of nifedipine and TMB-8 on vasoconstriction induced by alfa-1 adrenoceptor agonists in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 183(4): 1246-1247.
- AMBROZY SL.; SHEHIN SE.; CHIOU CY.; SOWERS JR.; ZEMEL MB. (1991). Effects of dietary calcium on blood pressure, vascular reactivity and vascular smooth muscle calcium efflux rate in Zucker rats. *Am J Hypertens.* 4(7 Pt 1). P 592-6.
- ANDO K.; SATO Y.; ONO A.; TAKAHASHI K.; SHIMOSAWA T.; OGATA E.; FUJITA T. (1991). Antihypertensive effect of dietary calcium loading in angiotensin II-salt rats. *Am J Physiol.* 261(5 Pt 2). P R1070-4.
- AOKI K. and SUZUKI T. (1991). The failure of increased serum potassium to enhance the pressor response to infused calcium in normotensive men. *J Hypertens.* 9(1). P 91-5.
- ARVOLA P.; PORSTI I. and VAPAATALO H. (1990). Effects of oral calcium supplementation on blood pressure and vascular smooth muscle relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 183(4): 1314.
- AZRIA M. (1989). Las calcitoninas: Fisiología y Farmacología. Ediciones Mayo, S.A. 1: 12-19.
- BEAN B.P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atical cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 86: 1-30.
- BENHAM (1990). Vascular smooth muscle calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* 183(1): 9.
- BELIZAN JM. y VILLAR J. (1980). The relationship between calcium intake and edema-, proteinuria-, and hypertension-gestosis: a hypothesis. *American Journal of Clinical Nutrition* 33: 2202-2210.

- BELIZAN JM.; PINEDA O.; SAINZ E.; MENENDEZ LA.; VILLAR J. (1981). Rise of blood pressure in calcium-deprived pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 141: 163-169.
- BELIZAN JM.; VILLAR J.; PINEDA O.; GONZALEZ AE.; SAINZ E.; ET AL. (1983a). Reduction of blood pressure with calcium supplementation in young adults. *Journal of the American Medical Association*. 249: 1161-1165.
- BELIZAN JM.; VILLAR J.; ZALAZAR A.; ROJAS L.; CHAN D. ET AL. (1983b). Preliminary evidence of the effect of calcium supplementation on blood pressure in normal pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 146: 175-180.
- BELIZAN JM.; VILLAR J.; GONZALEZ L.; CAMPODONICO L.; BERGEL E. (1991). Calcium supplementation to prevent hypertensive disorders of pregnancy. *N Engl J Med*. 325(20). P 1399-405.
- BERRIDGE M.J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J*. 212: 849-858.
- BERTHELOT A. y GAIRARD A. (1980). Parathyroidhormone-desoxicortisone acetate induced hypertension in rat. *Clinical Science* 58: 365-371.
- BHALLA R.C.; WEBB R.C.; RINGH D.; ASHLEY T. and BROCK T. (1978). Calcium fluxes, calcium binding and adenosine cyclic 3'-5'-mono-phosphate dependent protein kinase activity in the aorta of spontaneously hypertensive and Kyoto-Wistar normotensive rats. *Mol. Pharmacol*. 14: 468-477.
- BLAKEBOROUGH P.; NEVILLE SG.; ROLLS BA. (1990). The effect of diets adequate and deficient in calcium on blood pressures and the activities of intestinal and kidney plasma membrane enzymes in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr*. 63(1). P 65-78.
- BLAUSTEIN MP. (1977). Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and hypothesis. *Am J Physiol* 232: C165-C173.

- BOGIN E.; MASSRY SG. and HARARY I. (1981). Effect of parathyroid hormone on rat heart cells. *J. Clin. Invest.* 67: 1215-1227.
- BOGIN E.; MASSRY SG.; LEVI J.; DJALDETI M.; BRISTOL G.; SMITH J. (1982). Effect of parathyroid hormone on osmotic fragility of human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 9: 1017-1025.
- BOHR D.F. (1963). Vascular smooth muscle: Dual effect of calcium. *Science.* 139: 597-599.
- BOHR DF. and WEBB RC. (1984). Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *Am J Med.* 77(4A), P 3-16.
- BOLTON T. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 3: 606-718.
- BOND M.; KITAZAWA T.; SOMLYO AP.; SOMLYO AV. (1984). Release and recycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig portal vein smooth muscle. *J. Physiol.* 355: 677-695.
- BORLE AB. (1968). Calcium metabolism in HeLa cells and the effect of parathyroid hormone. *J. Cell. Biol.* 36: 567-582.
- BOROWITZ J.L.; STEBBINS G.; ISOM G.E. (1987). Studies of the hypotensive effect of calcium injected into lateral brain ventricles. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 78: 375.
- BOU J. and MASSINGHAM R. (1986). Effect of diltiazem upon contractile responses to phenylephrine, cirazolina, Sgd 101/75, St 587 and B-HT 920 in rabbit aorta and dog saphenous vein preparations. *Eur. J. Pharmacol.* 121: 319-325.
- BREDT DS. y SNYDER SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2): 682-5.

- BRICKMAN A.; NYBY M.; VON HUNGEN K.; EGGENA P.; TUCK M. (1990). Calcitropic hormones, platelet calcium, and blood pressure in essential hypertension. *Hypertension*. 16(5): 515-22.
- BRICKMAN A.; NYBY M.; VON HUNGEN K.; EGGENA P.; TUCK M. (1991). Parathyroid hormone, platelet calcium, and blood pressure in normotensive subjects. *Hypertension*. 18(2): 176-82.
- BUSSE R.; MULSCH A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* 4. 265(1-2). P 133-6.
- BUSSE R.; LUCKHOFF A.; MULSCH A. (1991). Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res Cardiol.* 86 Suppl 2: 7-16.
- CASTRILLO J.M. y DIAZ CURIEL M. (1987). Hipercalcemia. En: Foz Sala M.; Erill S.; Soler-Argilaga C.: *Terapéutica en Medicina Interna*. Segunda edición. Ediciones Doyma. Barcelona. 164: 729-732.
- CATERAL W.; SEAGAR M.; TAKHASHI M.; NUNOKI K. (1989). Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Ann N Y Acad Sci.* 560: 1-14.
- CAUVIN, C. and VAN BREEMEN, C. (1985). Different Ca^{2+} channels along the arterial tree. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 7(Suppl. 4): S4-S10.
- CAUVIN C. and GREATER (1986). ^{45}Ca influx in mesenteric resistance vessels of the spontaneously hypertensive rat. In: Lichtlen PR, ed. *New Therapy of Ischaemic Heart Disease and Hypertension*. Exerpta Medica: Elsevier Science Publishers BV. 225-231.
- CAUVIN C.; GELBAND C.; VAN BREEMEN C. (1987). ^{45}Ca fluxes in rat mesenteric resistance vessels. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 10 Suppl 1P S44-8.
- COCA A. y DE LA SIERRA A. (1990). Flujos catiónicos en la hipertensión arterial esencial. *Hipertensión* 7(4): 172-183.

CRASS MF. y PANG PKT. (1980). Parathyroid hormone: a coronary artery vasodilator. *Science* 207: 1087-1089.

CHANG E.; KUNES J.; HAMET P.; TREMBLAY J. (1990). Increase of calmodulin activator in hypertension. Modulation by dietary sodium and calcium. *Am J Hypertens.* 3(8 Pt 2), P 210S-215S.

CHAUSMER AB.; SHERMAN BS. and WALLACH S. (1972). The effect of parathyroid hormone on hepatic cell transport of calcium. *Endocrinology.* 90: 663-672.

CHIU A. T.; McCALL D. E. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1986a). Pharmacological characteristics of receptor-operated and potential-operated channels in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 127: 1-8.

CHIU A. T.; McCALL D. E.; THOLEN M. J. M. C. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1986b). Ca^{++} utilization in the constriction of rat aorta to full and partial α_1 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 224-231.

DEBASS G.; HOFFMAN L.; LANDON E.; HURWITZ L. (1975). Electron microscopic localization of calcium in vascular smooth muscle. *Anat. Rev.* 182: 447-472.

DE LA SIERRA A.; HANNAERT PA.; SENN N. ET AL. (1989). Diminution de la capacité régulatrice de la pompe à calcium dans un sous-groupe de malade hypertendus essentiels. *Arch Mal Coeur.* 82: 1285-1288.

DELUCA H. F. and SCHNOES H. K. (1976). Metabolism and mechanism of action of vitamin D. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 631-666.

DELUCA H. F. and SCHNOES H. K. (1983). Vitamin D: recent advances. *Ibid.* 52: 411-439.

DETH R. and CASTEELS R. (1977). A study of releasable Ca^{++} fractions in smooth muscle cells of the rabbit aorta. *J. Gen. Physiol.* 69: 401-416.

- DETH R. and VAN BREEMEN C. (1977a). Relative contributions of Ca^{2+} influx and cellular Ca^{2+} release during drug-induced activation of the rabbit aorta. *J. Gen. Physiol.* 70: 129.
- DETH R. and VAN BREEMEN C. (1977b). Agonist-induced $^{45}Ca^{++}$ release from smooth muscle cells of the rabbit aorta. *J. Membr. Biol.* 30: 363-380.
- DROOGMAN G.; DECLERCK I and CASTEELS R. (1987). Effect of adrenergic agonists on Ca^{++} channel currents in single vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 409: 7-12.
- DRUEKE TB.; BOURGOUIN P.; POINTILLART A.; LACOUR B. (1990). Disturbances of calcium metabolism in experimental hypertension. *Miner Electrolyte Metab.* 16(1): 6-11.
- ENDO M.; TANAKA M. and OGAWA Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibers. *Nature* 228: 34.
- FABIATO A. and FABIATO F. (1972). Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemma calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ. Res.* 31: 293.
- FLECKENSTEIN, A. (1971). Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. *Calcium and the Heart* (ed P. Harris and L. Opie), Academic Press, New York. 135-138.
- FLECKENSTEIN A. (1983). *Calcium antagonism in Heart and Smooth muscle. Experimental facts and therapeutic prospect.* Wiley, New York. 1-399.
- FLEIN SF.; ZELIS R. (1982). Effects of diltiazem on total cardiac output distribution in conscious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 359-66.
- FLOREZ J.; ARMIJO J.A.; MEDIAVILLA A. (1986). Farmacología del calcio y fósforo y de su regulación. En: FLOREZ J.; ARMIJO J.A.; MEDIAVILLA A. *Farmacología Humana.* Edit. Univ. de Navarra. 56: 769-779.

- FORD L.E. and PODOLSKY R.J. (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 167: 58.
- FORSTERMANN U.; POLLOCK JS.; SCHMIDT HH.; HELLER M.; MURAD F. (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(5): 1788-92.
- FRASER D.R. (1980). Regulation of the metabolism of vitamin D. *Physiol. Rev.* 60: 551-613.
- FRIEDMAN M.; KACZOROWSKI G.; VANDLEN R.; KATZ G.; REUBEN JP. (1985). Ca^{++} and Ca^{++} -activated K^+ currents in cultured smooth muscle (A10) cells (abstr). *Fed. Proc.* 452.
- FUJITO K.; YOKOMATSU M.; ISHIGURO N.; NUMAHATA H.; TOMINO Y.; KOIDE H. (1991a). Effects of dietary Ca^{2+} on erythrocyte Na^{+} -transport systems in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci*. 81(1). P 107-12.
- FUJITO K.; YOKOMATSU M.; ISHIGURO N.; NUMAHATA H.; TOMINO Y.; KOIDE H. (1991b). Effects of dietary calcium on erythrocyte sodium ion transport systems in spontaneously hypertensive rats. *Contrib Nephrol.* 90P 54-8.
- FURCHGOTT R.F. and ZAWADZKI J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 373-6.
- FURSPAN PB.; RINALDI G.J.; HOFFMAN K.; BOHR D.F. (1989). Dietary calcium and cell membrane abnormality in genetic hypertension. *Hypertension* 14: 98-103.
- GAREL JM. and BESNARD P. (1979). Milk factors controlling the plasma calcitonin level in the newborn rat. *Endocrinology*. 104: 1617-1623.

- GILLESPIE J.S. and MUJE T.C. (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed-rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 30: 78-87.
- GILLESPIE J.S.; McCLAREN A. and POLLOCK D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed-cat and rat. *Br. J. Pharmacol.* 257-267.
- GITTES RF.; TOVERUD SU.; COOPER CW. (1968). Effects of hypercalcemia and hypocalcemia on the thyrocalcitonin content of rat thyroid glands. *Endocrinology.* 82: 83-90.
- GLOSSMAN H. FERRY D.R. (1983). Solubilization and partial purification of putative calcium-channels labelled with [H^3]-nimodipine. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmac.* 323: 279.
- GLOSSMAN, H.; FERRY, D.R.; STRIESSING, J.; GOLL, A.; and MOOSBURGER, K. (1987a). Resolving the structure of the Ca^{++} channel by photoaffinity. *Trends in Pharmacological Sciences* 8, 95-100.
- GLOSSMAN, H.; FERRY, D.R.; STRIESSING, J.; GOLL, A.; MOOSBURGER, K.; and SCHIRMER, M. (1987b). Interaction between calcium channel ligands and calcium channels. *Circulation Research* 61 (suppl. 1), I-30-I-36.
- GROBBEE DE.; HACKENG WHL.; BIRKENHAGER JC.; HOFMAN A. (1986). Intact parathyroid hormone (1-84) in primary hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension (A)*. 8: 299-308.
- GROBBEE DE.; HACKENG WHL.; BIRKENHAGER JC.; HOFMAN A. (1988). Raised plasma intact parathyroid hormone concentrations in young people with mildly raised blood pressure. *British medical Journal.* 296: 814-816.
- GROBBEE DE and WAALL-MANNING HJ. (1990). The role of calcium supplementation in the treatment of hypertension. *Drugs.* 39 (1): 7-18.

- HAGIHARA M.; TOGARI A.; MATSUMOTO S.; NAGATSU T. (1990). Dietary calcium deprivation increased the levels of plasma catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes of adrenal glands in rats. *Biochem Pharmacol.* 39(7): 1229-31.
- HAMILTON C.A.; REID J.L. and SUMNER D.J. (1983). Aorte effects of phenoxybenzamine on α -adrenoceptor responses in vivo and in vitro: relation of in vivo pressor responses to the number of specific binding sites. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 868-873.
- HAN C.; ABEL P.W. and MINNESMAN K.P. (1987). α 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{++} in smooth muscle. *Nature* 329: 333-335.
- HANO T.; BABA A.; TAKEDA J.; NISHIO I.; MASUYAMA Y. (1991). Antihypertensive effects of oral calcium supplementation in spontaneously hypertensive rats. *Contrib Nephrol.* 90P 36-41.
- HARRISON H.E. and HARRISON H.C. (1979). Calcium and Phosphate homeostasis. En Harrison H.E. y Harrison H.C.: *Disorders of calcium and phosphate Metabolism in childhood and adolescence.* Saunders Company. 2: 15-46.
- HASSAN T.J.; SADARUDDIN A.; JAFAREY SN. (1991). Serum calcium, urea and uric acid levels in pre-eclampsia. *JPMA J Pak Med Assoc.* 41(8), P 183-5.
- HATTORI K.; SANO H.; KUBOTA Y.; KAWAHARA J.; MIKI T.; SUZUKI H.; FUKUZAKI H. (1991). The effect of Ca and Mg supplementation and the role of the opioidergic system on the development of DOCA-salt hypertension. *Am J Hypertens.* 4(1 Pt 1), P 72-5.
- HAUSSLER M.R. and McCAIN T.A. (1977). Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action. *N. Engl. J. Med.* 297, 974-983.
- HAYNES ROBERT C. (1991). Agentes que afectan la calcificación: calcio, hormona paratiroidea, calcitonina, vitamina D y otros compuestos. En Goodman and Gilman A.: *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Séptima edición. Edit. Panamericana. 1446-1470.

- HELLSTROM J.; BIRKE G.; EDVALL CA. (1958). Hypertension in hyperparathyroidism. *British Journal of Urology*. 30: 13-24.
- HERMSMEYER K.; HATTON DA.; KARANJA N.; McCARRON D. (1990). Effects of dietary calcium on nimodipine-sensitive calcium channel function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 21(12 Suppl). P IV98-101.
- HOKIN M. R. and HOKIN L. V. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203: 976-977.
- HOLICK, M. F. (1981) The cutaneous photosynthesis of previtamin D_3 ; a unique photoendocrine system. *J. Invest. Dermatol.*, 76, 51-58.
- HULTER HN.; MELBY JC.; PETERSON JC.; COOKE CR. (1986). Chronic continuous PTH infusion results in hypertension in normal subjects. *Journal of Clinical Hypertension*. 4: 360-370.
- HUNG JS.; HUANG TY.; WU DL.; YEN MF.; TSAI SH.; DAHL HP.; NEATON J.; DAHL JC. (1990). The impact of dietary sodium, potassium and calcium on blood pressure. *Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chih*. 89(1): 17-22.
- HVARFNER A.; BERGSTROM R.; MORLIN C.; WIDE L.; LJUNGHALL S. (1987). Relationships between calcium metabolic indices and blood pressure in patients with essential hypertension as compared with a healthy population. *Journal of Hypertension*. 5: 451-456.
- HWANG K.; VAN BREEMEN C. (1985). Effects of the Ca agonist BAY K 8644 on ^{45}Ca influx and net Ca uptake into rabbit aortic smooth muscle. *Eur J. Pharmacol.* 116: 299-305.
- IMAOKA M.; MORIMOTO S.; KITANO S.; FUKUO F.; OGIHARA T. (1991). Calcium metabolism in elderly hypertensive patients: possible participation of exaggerated sodium, calcium and phosphate excretion. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 18(9): 631-41.

- ISO H.; TERAO A.; KITAMURA A.; SATO S.; NAITO Y.; KIYAMA M.; TANIGAKI M.; IIDA M.; KONISHI M.; SHIMAMOTO T. ET AL. (1991). Calcium intake and blood pressure in seven Japanese populations. *Am J Epidemiol.* 133(8): 776-83.
- ITOH T.; KANMURA Y.; KURIYAMA A. and SUZUKI H. (1984). Nisoldipine-induced relaxation in intact and skinned smooth muscles of rabbit coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 83: 243-258.
- ITOKAWA Y.; TANAKA C. and FUJIWARA M. (1974). Changes in body temperature and blood pressure in rats with calcium and magnesium deficiencies. *J. Appl. Physiol.* 37: 835-839.
- JIRAKULSOMCHOK S.; MOZAFFARI MS.; OPARIL S.; WYSS JM. (1990). Dietary Ca²⁺ increases natriuretic and diuretic responses to volume loading in NaCl-sensitive spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 8(10): 947-51.
- JOHNS A.; LEIJTEN P.; YAMAMOTO H.; KWANG H. and VAN BREEMEN C. (1987). Calcium regulation in vascular smooth muscle contractility. *Am J Cardiol.* 59: 18A-23A.
- JOHNSON NE.; SMITH EL.; FREUDENHEIM JL. (1985). Effects on blood pressure of calcium supplementation of women. *American Journal of Clinical Nutrition.* 42: 12-17.
- KAMM K. and STULL J. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 593-620.
- KARAKI H.; KUBOTO H.; URAKAWA N. (1979). Mobilization of stored calcium for phasic contractions induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 56: 237-245.
- KARPPANEN H. (1991). Minerals and blood pressure. *Ann Med.* 23(3): 299-305.
- KESTELOOT H. (1991). Relationship between dietary cations and blood pressure. *Ann Nutr Metab.* 35 Suppl 1: 109-18.
- KLEE CB. and NEWTON DL. (1985). Calmodulin: an overview. In: *Control and Manipulation of Calcium Movement*. Edit: JR. Parratt. Raven Press. New York. 131-146.

- KOBAYASHI J. (1957). On geographical relationship between chemical nature of drinkin water and death rate from apoplexy. *Berichte des Ohara Institute fur Landwirtschaftliche Biologie*. 11: 12-21.
- KOBINGER W. and PICHLER. L. (1982). Presynaptic activity of the imidazolina derivatine ST 587, a highly selective α_1 -adrenoceptor agonist. *Eur. J. PLharmacol* 82: 203-206.
- KOLOMIETS VV. (1991). Relation between calcium intake with food and arterial pressure in metallurgists of Donbass. *Vrach Delo*. 6: 39-42.
- KONDO K.; SUZUKI H.; HANDA M.; NAGAHAMA S and SARUTA T. (1981). Effects of intracerebroventricular administration of dopamine and metoclopramide on blood pressure in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 250: 273.
- KOTCHEN TA.; OTT CE.; WHITESCARVER SA.; RESNICK LM.; GERTNER JM.; BLEHSDHMIDT NG. (1990). Calcium, parathyroid hormone, and vitamin D in the "prehypertensive" Dahl salt-sensitive rat. *Am J Hypertens*. 3(8 Pt 2): 167S-170S.
- KOTCHEN TA.; KOTCHEN JM.; BOEGEHOLD MA. (1991). Nutrition and hypertension prevention. *Hypertension*. 18(3 Suppl). P 1115-20.
- KOWARSKI D.; SHUMAN H.; SOMLYO AP.; SOMLIO AV. (1985). Calcium release by noradrenaline from central sarcoplasmic reticulum in rabbit main pulmonary artery smooth muscle. *J. Physiol*. 366: 153-175.
- LAFFERTY FW. (1981). Primary hyperparathyroidism: changing clinical spectrum, prevalence of hypertension and discriminant analysis of laboratory test. *Archives of Internal Medicine*. 141: 1761-1766.
- LANDS A.M.; ARNOLD A.; MCANLIFF J.P.; LUDUENA F.P. and BROWN T.G.Jr. (1967). Differentiations of receptor systems activate by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.
- LANGER S.Z. (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol*. 23: 1973.

- LANGER S.Z. (1981). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.* 32: 337-362.
- LANGER S.Z. and SHEPPERSON N.B. (1982). Postfunctional alpha1 and alpha2 adrenoceptors and the role of neuronal uptake. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4: S8-S13.
- LARKINS, R.G.; McAULEY, S.J.; RAPAPORT, A.; MARTIN, T.J.; TULLOCH, R.B.; BYFIELD, P.G.H.; MATTHEUS, E.W.; and McINTYRE, I. (1974). Effects of nucleotides, hormones, ions and 1,25-dihydrocholecalciferol production in isolated chick renal tubules. *Clin. Sci. Mol. Med.* 46, 569-582.
- LAU K.; CHEN S. and EBY B. (1984). Evidence for the role of PO_4 deficiency in antihypertensive action of high-Ca diet. *Am. J. Physiol.* 246: H324-H331.
- LAURENCE D.R.; BENNET P.N. *Clinical Pharmacology*. Edit.: Churchill Livingstone. Edimburgh, London and New York. 1987. 40: 749-758.
- LEIJTEN P.; VAN BREEMEN C. (1984). The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in the rabbit aorta. *J Physiol* 357: 327-339.
- LEWANCZUK RZ.; PANG PK. (1990). Vascular and calcemic effects of plasma of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 3(8 Pt 2): 189S-194S.
- LOPEZ-JARAMILLO P.; GONZALEZ MC.; PALMER RM.; MONCADA S. (1990). The crucial role of physiological Ca^{2+} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol.* 101(2): 489-93.
- LOPEZ-JARAMILLO P.; DE FELIX M. (1991). Prevention of toxemia of pregnancy in Ecuadorian Andean women: experience with dietary calcium supplementation. *Bull Pan Am Health Organ.* 25(2): 109-17.
- LOSSNITZER K.; PFENNIGSDORF G.; BRÄUER H. (1983). I Estructura del miocardio y su función. Estructura y función del músculo cardíaco, esquelético y liso. En LOSSNITZER K.; PFENNIGSDORF G.; BRÄUER H.: *Miocardio, Vasos sanguíneos, Calcio*. Edit. Knoll AG, Ludwigshafen. 49-50.

- LOUTZENHISER R.; VAN BREEMEN C. (1983a). The influence of receptor occupation on Ca^{2+} influx-mediated vascular smooth muscle contraction. *Circ Res* 52 (suppl 1): 97-103.
- LOUTZENHISER R.; VAN BREEMEN C. (1983b). Mechanisms of stimulated Ca^{2+} influx and consequences of Ca^{2+} influx inhibitions. In: Merrill GF.; Weiss HR.; Scriabine A (eds). Symposium on Ca^{2+} entry blockers, adenosine and neurohumors. Urban & Schwarzenberg. München Wien Baltimore. 73-91.
- LOUTZENHISER R.; LEIJTEN P.; SAIDA K.; VAN BREEMEN C. (1985). Calcium compartments and mobilization during contraction of smooth muscle. In: Grover AK.; Daniel EE. eds. Calcium and Contractility. Clifton NJ. Humana Press. 61-91.
- LUES I. and SCHÜMANN H. J. (1984). B-HT 920 acts as an α -1 adrenoceptor agonist in the rabbit aorta under certain in vitro conditions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 325: 42-46.
- LUFT FC. (1990). Putative mechanism of blood pressure reduction induced by increases in dietary calcium intake. *Am J Hypertens.* 3(8 Pt 2): 156S-160S.
- LUFT FC.; MILLER JZ.; GRIM CE.; FINEBERG NS.; CHRISTIAN JC.; DAUGHERTY SA.; WEINBERGER MH. (1991). Salt sensitivity and resistance of blood pressure. Age and race as factors in physiological responses. *Hypertension.* 17(1 Suppl): 1102-8.
- LUGNIER C. (1991). Calcium-calmodulin and vasomotor activity. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 84 Spec No 1: 25-34.
- LLINAS, 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.
- MANGIARUA EI.; WRIGHT GL.; McCUMBEE WD (1990). Effect of dietary calcium on in vitro aortic tissue responsiveness to a hypertensive factor. *Clin Exp Hypertens [A]*. 12(7): 1255-79.

- MANN JFE.; BOMMER J.; KREUSSER W.; KLOOKER P.; RAMBAUSEK M. and RITZ E. (1984). Parathormone and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* 178: 291-293.
- McCARRON DA.; YUNG NN.; UGORETZ BA. and KRUTZIK S. (1981). Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 3 (suppl 1): 1162-1167.
- McCARRON DA. (1982). Blood pressure and calcium balance in the Wistar-Kyoto rat. *Life Sci.* 30: 683-689.
- McCARRON DA.; MORRIS CD.; HENRY HJ.; STANTON JL. (1984). Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 224: 1392-1398.
- McCARRON DA. (1985). Is calcium more important than sodium in the pathogenesis of essential hypertension?. *Hypertension*, 7: 607-627.
- McCARRON DA.; MORRIS CD. (1985). Blood pressure response to oral calcium in persons with mild to moderate hypertension. *Annals of Internal Medicine.* 103: 825-831.
- McCARRON DA.; MORRIS CD.; YOUNG E.; ROULLET C.; DRUEKE T. (1991). Dietary calcium and blood pressure: modifying factors in specific populations. *Am J Clin Nutr.* 54(1 Suppl): 215S-219S.
- McCAULEY; CHAPMAN K.; NELSON RA. (1990). The case for dietary management of the older hypertensive. *Geriatrics.* 45(4): 69-72, 74-6.
- McGARVEY ST.; ZINNER SH.; WILLETT WC.; ROSNER B. (1991). Maternal prenatal dietary potassium, calcium, magnesium, and infant blood pressure. *Hypertension.* 17(2): 218-24.
- MEYER B.; SCHMIDT K.; HUMBERT R.; & BOHME E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cell Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 678-685.

MILLER R. J. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235: 46-52.

MOCHIZUKI M.; MORIKAWA H.; YAMASAKI M.; MARUO T. (1991). Vascular reactivity in normal and abnormal gestation. *Am J Kidney Dis.* 17(2): 139-43.

MONCADA S. & PALMER R.M.J. (1990). The L-arginine: nitric oxide pathway in the vessel wall. In: Moncada S. & Higgs E.A. Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory System. Amsterdam: Elsevier. 17-31.

MONTOLIU J. (1988). Alteraciones del metabolismo del calcio, fosfato y magnesio. En Ferreras-Rozman: Medicina Interna. Decimoprimer edición, Edit. Doyma, Barcelona. 1655-1662.

MORI Y.; FRIEDRICH T.; KIM MS. MIKAMI A.; NAKAI J.; RUTH P.; BOSSE E; HOFMANN F.; FLOCKERZI V.; FURUICHI T.; ET AL. (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350: 398-402.

MULVANY M.J.; AALKJAER C.; CHRISTENSEN J. (1980a). Changes in noradrenaline sensitivity and morphology of arterial resistance vessels during development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2: 664-71.

MULVANY M.J.; NYBORG N.; NILSSON H. (1980b). Effect of sodium-potassium-dependent ATPase inhibition on noradrenaline-activated calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in adult spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 59: 203s-5s.

MULVANY M.J. and VIDEBACK L.M. (1990). Potential sensitivity of calcium channels in micro vessels: functional implications. *Eur. J. Pharmacol* 183 (1): 10.

NEUSER D.; SCHULTE-BRINKMANN R.; KNORR A.; KAZDA S. (1990). Long-term hypotensive effect of parathyroid hormone in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 182(3): 569-71.

NEUSER D.; SCHULTE-BRINKMANN R.; KAZDA S. (1991). Influence of transplantation of parathyroid glands on blood pressure development in stroke prone spontaneously

- hypertensive rats and in normotensive Wistar Kyoto rats. *Clin Exp Hypertens [A]*. 13(3): 325-38.
- NICHOLS A.J. and RUFFOLO R.R. Jr. (1986). The relationship between alterations in α 1-adrenoceptor reserve by phenoxybenzamine and benextramine and the sensitivity of cirazolina-induced pressor responses to inhibition by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 126: 297-301.
- NOWYCKY M.; FOX A.P.; TSIEN R.N. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440-443.
- OLIVAN MARTINEZ J.; PEREZ CANO R.; MIRANDA GARCIA MJ.; MONTOYA GARCIA MJ.; MORUNO GARCIA R.; CUENCA LOPEZ L.; GARRIDO PERALTA M. (1989). Effect of an oral calcium supplement in the treatment of slight-to-moderate essential arterial hypertension. *An Med Interna. Apr.* 6(4): 192-6.
- OPARIL S.; WYSS JM.; YANG RH.; JIN HK.; CHEN YF. (1990). Dietary Ca^{2+} prevents NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats by a sympatholytic mechanism. *Am J Hypertens.* 3(8 Pt 2): 179S-188S.
- OPARIL S.; CHEN YF.; JIN HK.; YANG RH.; WYSS JM. (1991). Dietary Ca^{2+} prevents NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats via sympatholytic and renal effects. *Am J Clin Nutr.* 54(1 Suppl): 227S-236S.
- ORWOLL ES. y OVIATT S. (1990). Relationship of mineral metabolism and long-term calcium and cholecalciferol supplementation to blood pressure in normotensive men. *Am J Clin Nutr.* 52(4): 717-21.
- PALMER R.M.J.; FERRIGE A.G. and MONCADA S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-6.
- PALMER R.M.J. & MONCADA S. (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 348-352.

- PANG PK.; LEWANCZUK RZ.; BENISHIN CG. (1990a). Parathyroid hypertensive factor. *J Hypertens Suppl.* 8(7): S155-9.
- PANG PK.; KANEKO T.; LEWANCZUK RZ. (1990b). Parathyroid origin of a new hypertensive factor. *Exp Gerontol.* 25(3-4): 269-77.
- PANG PK.; BENISHIN CG.; LEWANCZUK RZ. (1991). Parathyroid hypertensive factor, a circulating factor in animal and human hypertension. *Am J Hypertens.* 4(6 Pt 1): 472-7.
- PEACOCK M. (1981). Control endocrino del metabolismo fosfocálcico y su patología. En *Medicine*, tercera serie, número 16. Edit. Idepsa. Madrid. 1112-1122.
- PERNOT F.; SCHLEIFFER R.; BERGMANN C.; VINCENT M.; ASSARD J.; GAIRARD A. (1990a). Dietary calcium, vascular reactivity, and genetic hypertension in the Lyon rat strain. *Am J Hypertens.* 3(11): 846-53.
- PERNOT F.; SCHLEIFFER R.; VINCENT M.; ASSARD J.; GAIRARD A. (1990b). Parathyroidectomy in the Lyon hypertensive rat: cardiovascular reactivity and aortic responsiveness. *J Hypertens.* 8(12): 1111-7.
- PERNOT F.; LUTHRINGER C.; VINCENT M.; SASSARD J.; BERTHELOT A.; GAIRARD A. (1991). Calcium metabolism in the Lyon hypertensive rat. *Ann Nutr Metab.* 35(1): 45-52.
- PORSTI I.; WUORELA H.; ARVOLA P.; SAYNAVALAMMI P.; NURMI AK.; HUHTALA H.; LAIPPALA P.; METSA-KETELA T.; VAPAATALO H. (1990a). Effects of calcium and deoxycorticosterone on blood pressure, plasma renin activity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens [A]*. 12(7): 1159-74.
- PORSTI I.; ARVOLA P.; WUORELA H.; ILKKA M.; SAYNAVALAMMI P.; HUHTALA H.; METSA-KETELA T.; VAPAATALO H. (1990b). Effects of a high calcium diet and deoxycorticosterone on vascular smooth muscle responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 8(9). P 835-41.
- PORSTI I.; WUORELA H.; ARVOLA P.; MAMMI P.; NURMI AK.; KOISTINAHO J.; LAIPPALA P.; VAPAATALO H. (1991). Effects of calcium supplementation and

- deoxycorticosterone on plasma atrial natriuretic peptide and electrolyte excretion in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand.* 141(3). P 343-50.
- PRIETO S. (1989). Regulación del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. Hormonas calcitrópicas. En: Fernandez-Tresguerres: Fisiología endocrina. Edit. Eudema. Madrid. 446-487.
- PUERRO M.; PINTADO KING A.; ALEIXANDRE MA. (1990). Potentiation of the vasoconstriction mediated by alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in pithed-rats by the calcium entry promoter BAY K 8644. *Eur. J. Pharmacol.* 183(3): 816-817.
- RANDRIANTSOA A.; HEITZ C.; STOCLET J. C. (1981). Functional characterization of postfunctional α -adrenoceptors in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 75: 57-60.
- RAPADO A.; CASTRILLO J.M. (1979). Avances en la fisiopatología y tratamiento de las hipercalcemias. *Rev. Clin. Esp.* 1979. 153: 243-249. (Citado en Castrillo y Diaz. 1987).
- RASMUSSEN H. (1970). Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170: 404-412.
- REGULLA S.; SCHNEIDER T.; NASTAINCZYK W.; MEYER H. E. and HOFMANN F. (1991). Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel alpha 1 subunit. *EMBO J.* 10(1), 45-49.
- REID J. L.; HAMILTON C. A. and HANNAH J.A. M. (1983). Peripheral α 1- and α 2-adrenoreceptor mechanisms in blood pressure control. *Chest.* 83: 302-304.
- REITZ RE.; DAANE TA.; WOODS JR.; WEINSTEIN RL. (1977). Calcium, magnesium, phosphorus, and parathyroid hormone interrelationships in pregnancy and newborn infants. *Obstetrics and Gynecology.* 50: 701-705.
- REPKE JT.; VILLAR J. (1991). Pregnancy-induced hypertension and low birth weight: the role of calcium. *Am J Clin Nutr.* 54(1 Suppl): 237S-241S.

RESNICK LM. (1987). Uniformity and diversity of calcium metabolism in hypertension: a conceptual framework. *American Journal of Medicine*. 2: 16-26.

RESNICK LM. (1990). Calcitropic hormones in human and experimental hypertension. *Am J Hypertens*. 3(8 Pt 2). P 171S-178S.

RESNICK LM. (1991). Calcium metabolism in hypertension and allied metabolic disorders. *Diabetes Care*. Jun. 14(6). P 505-20.

RESNICK LM.; MULLER FB.; LARAGH JH. (1986). Calcium-regulating hormones in essential hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 105: 649-654.

RINGER S. (1882). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricular contraction. *Journal of Physiol*. IV: 29-42, 222-225.

ROBERT L.; MOCZAR E. & PHAN-DINH-TUY (en prensa). Étude pharmacologique du pyrrolidone carboxylate de calcium. Première partie. Métabolisme et incorporation aux structures organiques et minérales de l'os.

ROBERT L.; MOCZAR E. & PHAN-DINH-TUY (en prensa). Étude pharmacologique du pyrrolidone carboxylate de calcium. Deuxième partie. Action sur la formation des osseux.

ROSEN J. F., and CHESNEY R. W. (1983). Circulating calcitriol concentrations in health and disease. *J. Pediatr.*, 103, 1-17.

ROST C. R.; BIKLE, D. D.; and KAPLAN, R. A. (1981). In vitro stimulation of 25-hydroxycholecalciferol 1 α -hydroxylation by parathyroid hormone in chick kidney slices: evidence for a role for adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*, 108, 1002-1006.

RUFFOLO R. R.; YADEN E. L. and WADDELL J. E. (1980). Receptor interactions of imidazolines. V. clonidine differentiates postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes in tissues from the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 213(3). P 557-61.

- RUFFOLO R. R.; WADDELL J. E. and YADEN E. L. (1981). Postsynaptic α adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of α -2 adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 217: 235-240.
- RUFFOLO R. R.; WADDELL J. E. and YADEN E. L. (1982). Heterogeneity of postsynaptic α -adrenergic receptors in mammalian aortas. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 221: 309-314.
- RUFFOLO R. R. and YADEN E. L. (1984). Existence of spare- adrenoceptors but not α 2-adrenoceptors for respective vasopressor effects of cirazolina and B-HT 920 in the pithed-rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 1011-1019.
- RUFFOLO R.R.; MORGAN E. L. and MESSICK (1984). Possible relationship between receptor reserve and the differential antagonism of α -1 and α -2 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium channel antagonists in the pithed-rat. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 230: 587-594.
- SAIDA K. (1981). Ca^{++} - and "depolarization"-induced Ca^{++} release in skinned smooth muscle fibers. *Biomedical Res.* 2: 453.
- SAIDA K. (1982). Intracellular Ca^{++} release in skinned smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 80: 191.
- SAIDA K. and NONOMURA Y. (1981). Characteristics of Ca^{++} release in skinned smooth muscle fibers. *Biomedical Res.* 2: 453.
- SAIDA K. and VAN BREEMEN C. (1984a). Characteristics of the norepinephrine-sensitive Ca^{++} store in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 21:43.
- SAIDA K. and VAN BREEMEN C. (1984b). Cyclic AMP modulation of adrenoceptor mediated arterial smooth muscle contraction. *J. Gen. Physiol* 84: 307.
- SAITO K.; SANO H.; FURUTA Y.; YAMANISHI J.; OMATSU T.; ITO Y.; FUKUZAKI H. (1991). Calcium supplementation in salt-dependent hypertension. *Contrib Nephrol.* 90P 25-35.

SCROGIN KE.; HATTON DC.; McCARRON DA. (1991). The interactive effects of dietary sodium chloride and calcium on cardiovascular stress responses. *Am J Physiol.* 261(4 Pt 2), P R945-9.

SCHLEIFFER R.; BERTHELOT A.; GAIIVARD A. (1979). Action of parathyroid extraction on arterial blood pressure and on contraction and ^{45}Ca exchange in isolated aorta of the rat. *European Journal of Pharmacology.* 58: 163-167.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. and FRANCKOWIAK, G. (1983a). Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines: a new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. *Arzneimittel Forschung/Drugs Research* 33, 1268-1272.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. and FRANCKOWIAK, G. (1983b). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{++} channels. *Nature* 303, 535-536.

SCHWART A. and TRIGGLE DJ. (1984). Cellular action of calcium channel blocking drugs. *Ann. Rev. Med.* 35:325.

SHIPLEY R. E. and TILDEN J. A. (1947). A pithed-rat preparation suitable for assaying pressor substances. *proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* vol. 64 n° 1: 453- 455.

SINGH RB.; SIRCAR AR.; RASTOGI SS.; SINGH R. (1990). Dietary modulators of blood pressure in hypertension. *Eur J Clin Nutr.* 44(4). P 319-27.

SOLER DE LA MANO F.J.; GARCIA PERIS P.; GARCIA ALMANSA A. (1985). Hiperparatiroidismos e hipoparatiroidismos. En *Medicine*, cuarta edición, número 37. Edit.: Idapsa, Madrid. 1543-1550.

SOMLYO A. P.; DEVINE C. E.; SOMLYO A. V. and NORTH S. R. (1971). Sarcoplasmic reticulum and temperature-dependent contraction of smooth muscle in calcium-free solutions. *J. Cell Biol.* 61: 722.

SOMLYO A. P.; SOMLYO A. V.; SHUMAN H. and EUDO M. (1982). Calcium and monovalent ions in smooth muscle. Fed. Proc. 41: 2882.

SOWERS JR.; ZEMEL MB.; ZEMEL PC.; STANDLEY PR. (1991). Calcium metabolism and dietary calcium in salt sensitive hypertension. Am J Hypertens. 4(6). P 557-63.

STARKE K. (1981). α -adrenoceptor subclassification. Rev. Physiol. Biochem Pharmacol 88: 199-236.

STERN N.; GOLUB M.; NYBY M.; BERGER M.; EGENA P.; LEE DBN.; TUCK ML. and BRICKMAN AS. (1987). Effect of high calcium intake on pressor responsivity in hypertensive rats. Am. J. Physiol. 252 (Heart. Circ. Physiol. 21): H1112-H1119.

STITT FW.; GLAYTON DG.; CRAWFORD MD.; MORRIS JN. (1973). Clinical and biochemical indicators of cardiovascular disease among men living in hard and soft water areas. Lancet. 1: 122-126.

SUEMATSU E.; HIRATA M.; HASHIMOTO T.; KURIYAMA H. (1984). Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca^{++} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. Biochem. Biophys. Res. Comm. 120: 481-485.

SULPILZIO A. and HIEBLE J. P. (1987). Demonstration of α PV2PV- adrenoceptor-mediated contraction in the isolated canine saphenous artery treated with BAY K 8644. Eur. J. Pharmacol. 135: 107-110.

SUTOO D.; MATSUKURA T. and AKIYAMA K. (1987). Effect of intraventricular administration of calcium and calmodulin antagonist on the blood pressure in the rat. Neurosci. Lett. 82, 297.

SUTOO D.; MATSUKURA T. and AKIYAMA K. (1988). The mechanism by which calcium reduces blood pressure. Eur. J. Pharmacol. 155: 189-192.

SUTOO D.; AKIYAMA K.; GEFFARD M. (1989). Central dopamine-synthesis regulation by the calcium-calmodulin-dependent system. Brain Res Bull. 22(3). P 565-9.

- SUTOO D.; MATSUKURA T. and AKIYAMA K. (1990). Reduction of blood pressure with calcium supplementation. *Eur. J. Pharmacol.* 183(4): 1313-1314.
- TANABE T.; TAKESHIMA H.; MIKAMI A.; FLOCKERZI V.; TAKAHASHI H.; KANGAWA K.; KOFIMA M.; MATSNO H.; HIROSE T. and NUMA S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature (Lond)*. 328: 313-318.
- TANABE T.; BEAN K. G.; ADAMS B. A.; NIIDOME T. and NUMA S. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*. 9. 346: 567-9
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and THOOLEN M. J. M. C. (1987). Equal potency of nifedipine to inhibit α_1 -(dobutamine and BDF 6143) and α_2 -adrenoceptor (B-HT 920) induced pressor responses in pithed rats; lack of effect of phenoxybenzamine. *Eur. J. Pharmac.* 140: 133-142.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN (1981). The postsynaptic α_2 -adrenoceptor. *J. Auton. Pharmacol.* 1: 171-183.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1982). α_2 - adrenoceptors classification, localization, mechanisms and targets for drugs. *J. Med. Chem.* 25: 1389-1401.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; MAN MEEL J. C. A.; DE JOUGE A.; MATHY M. J. and VAN ZWIETEN P. A. (1983a). Influence of nifedipine on functional responses in vivo intrated at α_2 -adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 1-6.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; MATHY M. J.; WILFFERT B.; KALKMAN A. O.; THOOLEN M. J. M. C.; DE JOUGE A.; VAN MEEL J. C. A. and VAN ZWIETEN P. A. (1983b). Differential effect of calcium entry blockers on α_1 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in vivo. *Arch. Pharmacol.* 324: 239-245.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; THOLLEN M. J. M. C.; MATHY M. J.; WILFFERT B.; DE JOUGE A. and VAN ZWIETEN P. A. (1983c). Sgd 101/75 is distinguished from other selective α_1 -adrenoceptor agonists by the inhibition of its pressor responses by calcium

- blockade and vasodilation in pithed rats and cats. *Eur. J. Pharmacol.* 96: 187-192.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; MATHY M. J.; THOOLEN M. J. M. C.; DE JOUGE A.; WILFFERT B. and VAN ZWIETEN (1984). Invariable susceptibility to blockade by nifedipine of vasoconstriction to various α_2 -adrenoceptor agonists in pithed-rats. *J. Pharm.* 36: 772-775.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; BECKERINGH J. J.; VAN ZWIETEN P. A. and THOOLEN M. J. M. C. (1987a). Sensivity of α_1 -adrenoceptor-mediated pressor responses to inhibition by Ca^{++} entry blockers in the pithed-rat: arguments against the role of receptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240(3): 864-870.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; CHIU A. T. and THOOLEN M. J. M. C. (1987b). Calcium handling in vasoconstriction to stimulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 1649-1657.
- TOGARI A.; ARAI M.; SHAMOTO T.; MATSUMOTO S. and NAGATSU T. (1989). Elevation of blood pressure in young rats fed a low calcium diet. Effects of nifedipine and captopril. *Biochemical Pharmacology*. Vol 38, 6: 889-893.
- TSIEN R.W.; BEAN B.P.; HESS P. and NOWYCKY M.C. (1983). Calcium channels: Mechanisms of β -adrenergic modulation and ion permeation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 157: 201-212.
- TSIEN R.W.; ELLINOR P.T.; HORNE W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends in Pharmac. Sci.* 12: 349-354.
- VAGHY P.L.; STRIESSING J.; MIWA K.; KNAUS H. G.; ITAGAKI K.; McKENNA E.; GLOOSMANN H. and SCHWARTZ A. (1987a). Identification of a novel 1,4-dihydropyridine and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *Journal of Biological Chemistry* 262: 14337-14342.
- VAGHY P.L.; WILLIAMS J.S. and SCHWARTZ A. (1987b). Receptor pharmacology of calcium entry blocking agents. *American Journal of Cardiology* 59: 9A-17A.

- VAN BERESTEIJN EC.; VAN SCHAIK M.; SCHAAFSMA G. (1990). Milk: does it affect blood pressure? A controlled intervention study.
J Intern Med. 228(5). P 477-82.
- VAN BREEMEN C. and DETH R. (1976). La^{3+} and excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle. In: Betz E. (ed): "Ionic Actions on Vascular Smooth Muscle". New York: Springer-Verlag. pp 26.
- VAN BREEMEN C. (1977). Calcium requirement for activation of intact aortic smooth muscle. J. Physiol. 272: 317-329.
- VAN BREEMEN C.; AARONSON P.; LOUTZENHISER R. (1979). Na^{++} , Ca^{++} interactions in mammalian smooth muscle. Pharmacol. Rev. 30: 167-208.
- VAN BREEMEN C.; LOUTZENHISER R.; MANGEL A.; MEISHERI K. (1980). Ca^{++} compartments in vascular smooth muscle. In Advances in Physiological Science, Vol 5, edited by Varga E.; A. Kover.; T. Kovacs.; L. Kovacs. Budapest. Pergamon Press. pp 47-58.
- VAN BREEMEN C.; HWANG K.; LOUTZENHISER R.; LUKEMAN S.; YAMAMOTO H. (1985). Ca entry into vascular smooth muscle. In: Fleckenstein E.; Van Breeman C.; Gross R.; Hoffmeister F. eds. Cardiovascular Effects of Dihydropyridine-Type Calcium Antagonists and agonists. Berlin: Springer Verlag. 58-75.
- VAN BREEMEN C.; LUKEMAN S.; LEIJTEN P.; YAMAMOYO H.; LOUTZENHISER R. (1986). The role of the superficial SR in modulating force development induced by Ca entry into arterial smooth muscle. J. Cardiovasc. Pharmacol. 8 Suppl 8P S111-6.
- VAN MEEL J. C. A.; DE JOUGE A.; WILFFERT B.; KALKMAN H. O.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1981a). Vascular smooth muscle contraction initiated by postsynaptic α_2 -adrenoceptor activation is induced by an influx of extracellular calcium. Eur. J. Pharmacol. 69: 205-208.

VAN MEEL J. C. A.; DE JOUGE A.; WILFFERT B.; KALKMAN H. O.; TIMMERMANS P.B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1981b). Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic α_2 -adrenoceptors. *Naunyn-schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 316: 288-293.

VAN MEEL J. C. A.; WILFFERT B.; DE ZOETEN K.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1982). The inhibitory effect of newer calcium antagonists (nimodipine and PY-408-068) on vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic α_2 -adrenoceptors. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* 260: 206-217.

VAN ZWIETEN P. A. (1986). Interaction between α - and β -adrenoceptor-mediated cardiovascular effects. *J. of Cardio. Pharmacol.* 8 (Suppl. 4): S21-S28.

VAN ZWIETEN P. A. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1984). Central and Peripheral α -adrenoceptors. Pharmacological aspects and clinical potencial. *Advances in Drug Research* vol. 13: 209-254.

VAN ZWIETEN P. A.; VAN MEEL J. C. A. and TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1982). Calcium antagonists and α_2 -adrenoceptors: Possible role of extracellular ions in α_2 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* vol. 4 (Suppl. 3): S273-S279.

VAN ZWIETEN P. A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and BRUMMELEN P. (1984). Role of alpha adrenoceptors in hypertension and in antihypertensive drug treatment. *The American Journal of Medicine.* 5: 17-25.

VAN ZWIETEN P. A.; TIMMERMANS P. B. M. W. M.; THOALEN M. J. M. C.; WILFFERT B. and DE JOUGE A. (1985). Calcium dependencag of vasoconstriction mediated bi- α_1 and α_2 -adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (Suppl. 6): S113-S120.

VILARDELL E. (1988). Enfermedades de las glándulas paratiroides. En Ferreras - Rozman: *Medicina Interna. Decimoprimer edición.* Edit. Doyma, Barcelona. 1889-1904.

- WEISSMAN N. y PILEGGI V. (1980). Iones inorgánicos. En: HENRY RJ.; CANNON DC.; WINKELMAN JW.: Química Clínica. Principios y Técnicas. Edit. Jims. 2ª Edición. 19: 643-762.
- WILFFERT B.; VAN HLININGEN P. N. M.; MATHY M. J.; BATIUK H. D.; DE JOUGE A.; THOOLEN M. J. M. C.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1984a). Lack of relationship between intrinsic activity and susceptibility of pressor responses to blockade by nifedipine among the α -2 adrenoceptor agonists B-HT 920 and B-HT 950. Naunyn-schmiedeb Arch. Pharmacol. 327: 90-XXX.
- WILFFERT B.; VAN HLININGEN P. N. M.; MATHY M. J.; DE JOUGE A.; THOOLEN M. J. M. C.; TIMMERMANS P. B. M. W. M. and VAN ZWIETEN P. A. (1984b). Interactions between the putative calcium entry promotor BAY K 8644 and pressor responses produced by α 1 and α 2-adrenoceptor agonists in the pithed normotensive rat. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 328: 76-XX.
- WILLIANSON JR.; COOPER RH.; SURESH JK.; THOMAS AP. (1985). Inositol triphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver. Am. J. Physiol. 248: C203-C216.
- WORLEY JF.; DEITMER JN.; NELSON MT. (1986). Single nisoldipine-sensitive calcium channels from smooth muscle cells isolated from rabbit mesenteric artery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(15). 5746-50.
- WUORELA H.; PORSTI I.; SILTALOPI E.; ARVOLA P.; NURMI AK.; SAYNAVALAMMI P.; VAPAATALO H. (1990). Deoxycorticosterone prevents the blood pressure-lowering effect of calcium in spontaneously hypertensive rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 12(1): 37-42.
- YAMAMOTO H.; VAN BREEMEN C. (1985). Inositol 1,4,5-triphosphate releases calcium from skinned cultured smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 130: 270-274.
- YAMAMOTO H.; HWANG O.; VAN BREEMEN C. (1984). BAY K 8644 differentiates between potential and receptor operated Ca^{2+} channels. Eur. J. Pharmacol. 102: 555-557.

ZAWADA ET.; BRICKMAN AS.; MAXWELL MH. and TUCK M. (1980). Hypertension associated with hyperparathyroidism is not responsive to angiotensin blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 912-915.

ZEMEL MB.; ZEMEL PC.; BRYG RJ.; SOWERS JR. (1990). Dietary calcium induces regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive non-insulin-dependent diabetic blacks. *Am J Hypertens.* 3(6 Pt 1). P 458-63.